



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ARTEMIZIA PESSOA GUIMARÃES

DETERMINAÇÃO DE HIDROCARBONETOS AROMÁTICOS
POLICICLICOS (HPAS) EM ALIMENTOS OBTIDOS POR TÉCNICAS
DIFERENTES

FORTALEZA

2014

ARTEMIZIA PESSOA GUIMARÃES

DETERMINAÇÃO DE HIDROCARBONETOS AROMÁTICOS POLICICLICOS
(HPAS) EM ALIMENTOS OBTIDOS POR TÉCNICAS DIFERENTES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Goretti Vasconcelos Silva

Coorientador: Prof. Dr. Rivelino Martins Cavalcante.

FORTALEZA

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

G976d Guimarães, Artemizia Pessoa.
Determinação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPAs) em alimentos obtidos por técnicas diferentes / Artemizia Pessoa Guimarães. – 2014.
86 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2014.

Orientação: Profa. Dra. Maria Goretti Vasconcelos Silva.

Coorientação: Prof. Dr. Rivelino Martins Cavalcante.

1. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. 2. Soxhlet. 3. Dispersão da matriz em fase sólida. 4. *Anacardium occidentale*. 5. *Lycopersicon esculentum*. I. Título.

CDD 540

ARTEMIZIA PESSOA GUIMARÃES

DETERMINAÇÃO DE HIDROCARBONETOS AROMÁTICOS POLICICLICOS
(HPAS) EM ALIMENTOS OBTIDOS POR TÉCNICAS DIFERENTES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química.

Aprovada em: 26/02/2014.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Goretti Vasconcelos Silva (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Rivelino Martins Cavalcante (Co-orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Maria das Graças Gomes
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Paulo Henrique Machado Sousa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dedico este trabalho com muito amor e carinho, aos meus pais, Eduardo e Fátima.

Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre está presente em minha vida, iluminando meus caminhos.

Aos meus pais, Eduardo Guimarães e Fátima Pessoa, e aos meus irmãos Alisson Guimarães e Artemis Pessoa pelo amor e carinho, incansável incentivo e, por que sempre me acompanhem em todos os momentos e conquistas da minha vida. Esta caminhada não teria sido a mesma sem vocês.

À profa. Dra. Maria Goretti Vasconcelos Silva pela amizade, pela orientação neste trabalho e pela oportunidade em participar do grupo de pesquisa do Laboratório de Produtos Naturais (LPN).

Ao meu co-orientador prof. Dr. Rivelino Martins Cavalcante pelas sugestões que enriqueceram meu trabalho, pelo acolhimento no laboratório LaCOOr -Labomar (Laboratório de Contaminantes Orgânicos), pela amizade, incentivo e dedicação.

Ao Laboratório de análise de traços na pessoa do Prof Dr. Ronaldo Ferreira do Nascimento por ter cedido o cromatógrafo gasoso.

Aos meus queridos amigos do LaCor –Labomar pela ajuda, ótima convivência, e amizade. Agradeço em especialmente aos amigos: Wersângela Cunha, Pollyana Morais, Allyne Gama e André Oliveira pelas incansáveis ajudas nos meus experimentos e companheirismo ao longo da caminhada, meu muito obrigada.

Aos meus amigos de laboratório do LPN: Elayne Bessa, Juliana Gaspar, Isabel Fernandes, Barbara de Fátima, Lucy, Irvila Ricarte, Jackeline Vieira, Thiago Augusto, Rhuana Pires e Milton pela amizade e agradável convivência.

À minha querida amiga Célia Castro pela sua amizade, apoio, incentivo e por suas orações poderosas.

À minha amiga Renata Oliveira pela sua amizade, pelas horas de estudos nas disciplinas do mestrado e pela sua incansável ajuda do desenvolver do trabalho.

Aos meus queridos e amados amigos, Lízias Cláudia, Karen Cristina, Francileide Oliveira, Cristina Bastos, Ricardo Douglas, Viviane Gomes pela amizade e apoio em todos os momentos.

Ao Nutec e Padetec pela liofilização das amostras.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Capes pela bolsa de estudos concedida.

Faço um agradecimento especial aos amigos Vitor e Pollyana. Sem vocês eu não teria conseguido realizar os últimos experimentos.

Enfim, à todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

"Tudo começa pequeno nessa vida;
E só cresce se o permitimos!"

(Pe. Fábio de Melo)

RESUMO

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) constituem uma classe de compostos orgânicos, formados por átomos de carbono e hidrogênio, cuja estrutura forma de dois ou mais anéis aromáticos condensados. Geralmente, os HPAs são formados a partir da combustão incompleta de material orgânico e são considerados poluentes orgânicos persistentes, uma vez que apresentam atividades mutagênicas e carcinogênicas, as quais causam impactos negativos à saúde humana e ao meio ambiente. Os alimentos representam uma importante fonte de exposição a esses compostos, de forma que a contaminação de alimentos pode ocorrer em virtude de certos tipos de processamento, tais como como defumação, torrefação e secagem direta com madeira, assim como devido à poluição do ar e da água e à presença de HPAs em solos. Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo estudar a extração de HPAs em dois tipos de frutos: caju (*Anacardium occidentale*) e o tomate (*Lycopersicum esculentum*), utilizando-se as seguintes técnicas: Dispersão da Matriz em Fase Sólida (DMFS) e extração por Soxhlet. As análises de identificação e quantificação de HPAs foram realizadas por cromatografia gasosa com detecção de massas (CG-EM). A metodologia empregada também envolveu a validação dos métodos de extração e análise de HPAS em matéria orgânica, de forma que os métodos validados foram aplicados às amostras de interesse. De maneira geral, a metodologia empregada apresentou bons resultados de recuperação, precisão, limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) para os HPAs analisados. Para o presente trabalho, o LD variou de 6,71 a 76,12 μgL^{-1} e o LQ de 22,36 a 253,73 μgL^{-1} , estando estes dados em conformidade com dados da literatura. O estudo da linearidade gerou resultados de coeficiente de correlação superior a 0,99, o que se enquadra nas recomendações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária e do Instituto Nacional de Metrologia. Foram realizadas extrações de HPAs provenientes de amostras de caju e tomate pelos métodos Soxhlet e DMFS, nas concentrações de 20, 50 e 100 μgL^{-1} . De maneira geral, a recuperação se mostrou mais eficiente com o aumento da concentração. Para o método Soxhlet, os resultados obtidos também mostraram que a recuperação foi mais eficiente para as amostras de tomate. Em termos comparativos entre as duas técnicas aplicadas, para as amostras de frutos analisadas, o método DMFS mostrou-se mais adequado, tendo sido possível recuperar os 16 HPAs analisados em percentuais mais elevados que pelo o método Soxhlet.

Palavras-chave: Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos. Soxhlet. Dispersão da Matriz em Fase Sólida. *Anacardium occidentale*, *Lycopersicum esculentum*.

ABSTRACT

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are a class of organic compounds that consist of carbon and hydrogen atoms in aromatic ring structures. The PAHs are produced from incomplete combustion of organic material and can be considered persistent organic pollutants. They present mutagenic and carcinogenic activities, which cause negative impacts on human health and the environment. Food represents an important source of exposure to these compounds. Foods contaminations can occur due to processing such as smoking, roasting and direct drying with wood, air and air pollution. water and the presence of PAHs in soils. The present study aimed to study the extraction of PAHs in two types of fruits: cashew (*Anacardium occidentale*) and tomatoes (*Lycopersicum esculentum*), using the following techniques: Solid Phase Matrix Dispersion (DMFS) and Soxhlet extraction. The analysis of identification and quantification of PAHs were performed by gas chromatography with mass detection (GC-MS). The methodology used also involved the validation of the PAHs extraction and analysis methods in organic matter. The validated methods were applied to the samples of interest. The methodology used presented good results of recovery, precision, limit of detection (LD) and quantification (LQ) for the analyzed PAHs. For this study, the LD ranged from 6.71 to 76.12 μgL^{-1} and the LQ ranged from 22.36 to 253.73 μgL^{-1} . These results are in agreement with the literature. The study of linearity generated results with a correlation coefficient greater than 0.99, which fits the recommendations of the National Health Surveillance Agency and the National Metrology Institute. Extractions of PAHs from cashew and tomato samples were performed using the Soxhlet and DMFS methods, at concentrations of 20, 50 and 100 μgL^{-1} . In general, the PAHs recovery was more efficient with increasing the concentration. For the Soxhlet method, the results obtained also showed that the recovery was more efficient for tomato samples. The DMFS method proved to be more appropriate for the fruit samples analyzed because it was possible to recover the 16 PAHs analyzed in higher percentages than by the Soxhlet method.

Keywords: Polycyclic aromatic hydrocarbons. Soxhlet. Solid Phase Matrix Dispersion. *Anacardium occidentale*. *Lycopersicum esculentum*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Estrutura e nomenclatura dos 16 HPAs prioritários.....	19
Figura 2	– Relação das técnicas de extração com os anos de publicação.....	25
Figura 3	– Relação das técnicas em função dos diferentes tipos de alimentos.....	26
Figura 4	– Etapas de extração DMFS.....	28
Figura 5	– <i>Clean up</i>	36
Figura 6	– Etapas da extração: (a) preparo da amostra; (b) preparo da coluna e (c) extração por DMFS.....	37
Figura 7	– Esquema do programa de temperatura de separação dos HPAs.....	40
Figura 8	– Cromatograma de separação dos HPAs utilizando CG-MS.....	41
Figura 9	– Cromatograma obtido de uma solução padrão contendo os 16 HPAs prioritários na concentração de 1 mg/L.....	45
Figura 10	– Recuperações de HPAs utilizando soxhlet em amostras de caju na concentração de 20 μgL^{-1}	47
Figura 11	– Cromatograma da amostra de caju - 20 μgL^{-1}	47
Figura 12	– Recuperações de HPAs utilizando soxhlet em amostras de caju na concentração de 50 μgL^{-1}	49
Figura 13	– Cromatograma da amostra de caju - 50 μgL^{-1}	50
Figura 14	– Recuperações de HPAs utilizando soxhlet em amostras de caju na concentração de 100 μgL^{-1}	51
Figura 15	– Cromatograma da amostra de caju - 100 μgL^{-1}	52
Figura 16	– Cromatograma da amostra de caju.....	53
Figura 17	– Recuperações de HPAs utilizando soxhlet em amostras de tomate na concentração de 20 μgL^{-1}	55
Figura 18	– Cromatograma da amostra de caju - 20 μgL^{-1}	56
Figura 19	– Recuperações de HPAs utilizando soxhlet em amostras de tomate na	

concentração de 50 μgL^{-1}	57.
Figura 20 – Cromatograma da amostra de caju - 50 μgL^{-1}	58
Figura 21 – Recuperações de HPAs utilizando soxhlet em amostras de tomate na concentração de 100 μgL^{-1}	59
Figura 22 – Cromatograma da amostra de caju - 50 μgL^{-1}	60
Figura 23 – Comparação das recuperações de HPAs utilizando Soxhlet em amostras de caju.....	61
Figura 24 – Comparação das recuperações de HPAs utilizando Soxhlet em amostras de tomate.....	62
Figura 25 – Recuperação dos HPAs utilizando DMFS em amostras de caju e tomate na concentração de 20 μgL^{-1}	63
Figura 26 – Cromatograma da amostra de caju 20 μgL^{-1}	63
Figura 27 – Cromatograma da amostra de tomate 20 μgL^{-1}	63
Figura 28 – Recuperação dos HPAs utilizando DMFS em amostras de caju e tomate na concentração de 50 μgL^{-1}	66
Figura 29 – Cromatograma da amostra de caju na concentração de 50 μgL^{-1}	66
Figura 30 – Cromatograma da amostra de tomate na concentração de 50 μgL^{-1}	68
Figura 31 – Recuperação dos HPAs utilizando DMFS em amostras de caju e tomate na concentração de 100 μgL^{-1}	69
Figura 32 – Cromatograma da amostra de caju 100 μgL^{-1}	70
Figura 33 – Cromatograma da amostra de tomate 100 μgL^{-1}	71
Figura 34 – Comparação das recuperações de HPAs utilizando DMFS em amostras de caju.....	72
Figura 35 – Comparação das recuperações de HPAs utilizando DMFS em amostras de tomate.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – HPAs identificados nos últimos anos.....	20
Tabela 2 – Procedência dos reagentes utilizados.....	34
Tabela 3 – HPAs de interesse com número de anéis, m/z (relação carga/massa), TR (tempo de retenção) e padrão <i>surrogate</i> correspondente.....	39
Tabela 4 – Dados da estimativa da fidelidade através da repetibilidade do padrão interno (PI).....	42
Tabela 5 – Parâmetros utilizados na curva de calibração.....	43
Tabela 6 – Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).....	44
Tabela 7 – Nomenclatura dos HPAs prioritários, tempo de retenção e íon molecular.....	46
Tabela 8 – Análise da amostra de caju.....	53
Tabela 9 – Análise da amostra de tomate.....	62
Tabela 10 – Análise de tomate pelo método DMFS.....	73
Tabela 11 – Análise de caju pelo método DMFS.....	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ace	Acenafteno
Acy	Acenaftileno
Ant	Antraceno
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
2MeAnt	2-Metil-Antraceno
9MeAnt	9-Metil-Antraceno
BaA	Benzo[a]antraceno
BcF	Benzo[c]fluoranteno
BaP	Benzo[a]pireno
BbF	Benzo[b]fluoranteno
BcF	Benzo[c]fluoranteno
BghiP	Benzo[g,h,i]perileno
BjF	Benzo[j]fluoranteno
BkF	Benzo[k]fluoranteno
2BrNap	2-Bromonaftaleno
CcdP	Ciclopentano [cd] pireno
Chry	Criseno
5MeChry	5-metil-criseno
DaeP	Dibenzo[a,e]Pireno
DaiP	Dibenzo[a,i]Pireno
DalP	Dibenzo[a,l]Pireno
DahA	Dibenzo[a,h]antraceno
DahP	Dibenzo[a,h]pireno
DMFS	Dispersão da matriz em fase sólida
Flu	Fluoreno
Flr	Fluoranteno
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia
Phen	Fenantreno
Per	Perileno
IncdP	Indeno [1,2,3-cd] pireno
MeNap	Metilnaftaleno
2MeNap	2-metilnaftaleno
Nap	Naftaleno
Per	Perileno
Phen	Fenantreno
1,2-DMePhen	1,2Dimetil fenantreno
2,4-DMePhen	Dimetil- fenantreno
2-MePhen	2-metil- fenantreno
9-MePhen	9-metil- fenantreno
Pyr	Pireno
1MePyr	1Metil pireno
USEPA	Agência Proteção Ambiental Americana

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos.....	19
2.2 HPAs em alimentos.....	20
2.3 Métodos de extração.....	26
2.3.1 Extração por Soxhlet.....	27
2.3.2 Extração por dispersão da matriz em fase sólida	27
2.3.3 Extração por QuEChERS	28
2.4 Validação da metodologia cromatográfica.....	29
2.4.1 Fidelidade.....	30
2.4.1.1 Repetibilidade.....	30
2.4.1.2 Fidelidade Intermediária.....	31
2.4.2 Linearidade.....	31
2.4.3 Limite de detecção (LD).....	32
2.4.4 Limite de quantificação (LQ).....	32
2.4.5 Recuperação.....	33
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
3.1 Coleta e origem.....	34
3.2 Solventes e Reagentes.....	34
3.3 Limpeza das vidrarias.....	35
3.4 Liofilização.....	35
3.5 Extração de HPAs provenientes de materiais orgânicos.....	35
3.5.1 Extração por Soxhlet.....	35
3.5.2 Clean up.....	36
3.6 Dispersão da Matriz em Fase Sólida (DMFS).....	36
3.7 Identificação dos analitos de interesse	38
3.8 Condições cromatográficas para determinação de HPAs.....	39
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40

4.1 Validação da metodologia cromatográfica.....	40
<i>4.1.1 Programa de temperatura e resolução dos picos cromatográficos</i>	<i>40</i>
<i>4.1.2 Identificação dos HPAs e confirmação dos tempos de retenção</i>	<i>41</i>
4.2 Validação do método de análise de HPAs por CG-MS	42
<i>4.2.1 Fidelidade</i>	<i>42</i>
<i>4.2.2 Faixa linear de trabalho.....</i>	<i>43</i>
<i>4.2.3 Limite de detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ).....</i>	<i>44</i>
4.3. Extração por Soxhlet	45
4.4 Análise cromatográfica.....	45
4.5 Extrações de HPAs provenientes de amostra de caju pelo método Soxhlet.....	46
4.6 Extrações de HPAs provenientes de amostra de tomate pelo método Soxhlet....	55
4.7 Comparação das recuperações das amostras de tomate e caju.....	61
4.8 Extrações de HPAs provenientes de amostra de caju e tomate pelo método DMFS.....	62
<i>4.8.1 Extrações de HPAs provenientes de amostra de caju e tomate na concentração 20 µgL⁻¹.....</i>	<i>62</i>
<i>4.8.2 Extrações de HPAs provenientes de amostra de caju e tomate na concentração 50 µgL⁻¹.....</i>	<i>66</i>
<i>4.8.3 Extrações de HPAs provenientes de amostra de caju e tomate na concentração 100 µgL⁻¹.....</i>	<i>69</i>
<i>4.8.4 Comparação da eficiência de extração das amostras de caju e tomate na concentração nas diferentes concentrações.....</i>	<i>72</i>
<i>4.8.5 Análise das amostras de caju e tomate na concentração.....</i>	<i>73</i>
5 CONCLUSÃO	75
REFERÊNCIAS.....	76

1 INTRODUÇÃO

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) constituem uma família de compostos que são formados por átomos de carbono e hidrogênio e são caracterizados por possuírem dois ou mais anéis aromáticos condensados (JACQUES *et al.*, 2007; NETTO *et al.*, 2000). Estes compostos têm origens na combustão incompleta de madeira, carvão ou o óleo combustível, além de fontes antropogênicas (queima de carvão, óleos lubrificantes usados em motores, fumaça de cigarro), e atividades naturais (atividades vulcânicas e queimadas espontâneas) (BETTIN; FRANCO, 2005; FALCON; GANDARA, 2005; TFOUNI; TOLEDO, 2007).

Os HPAs têm sido detectados no ar, solo, água, plantas e alimentos. A presença destas substâncias em alimentos ocorre devido à poluição do ar, da água e do solo. As frutas e hortaliças que são cultivadas em áreas altamente industrializadas ou próximas a estradas apresentam geralmente maiores níveis de HPAs do que os de áreas rurais. Em áreas distantes de centros urbanos e industriais, os teores de HPAs são resultados da contaminação ambiental.

Os alimentos processados também são considerados uma importante fonte de exposição humana aos HPAs devido à formação durante o cozimento (grelhar, assar e fritas) e outros tipos de processamento (secagem e defumação) (CAMARGO; TOLEDO, 2003; CARUSO; ALABURDA, 2008; NETTO *et al.*, 2000; TFOUNI *et al.*, 2007a). Dentre as categorias de alimentos contaminados com HPAs pode-se citar como exemplos: óleos vegetais, margarinas, maionese, produtos lácteos, frutas, hortaliças, produtos defumados, chá, café, açúcar, cereais, água, alimentos de origem marinha, alimentos grelhados, entre outros (CARUSO; ALABURDA, 2008; TFOUNI *et al.*, 2007b) de modo que a contaminação de alimentos por estas substâncias tóxicas tem sido objeto de intensas pesquisas.

Os HPAs por apresentarem potenciais mutagênicos e carcinogênicos são bastante estudados e analisados (CAVACANTE, 2008; CARUSO; ALABUDA, 2008). Devido a essas características podem provocar o aparecimento de tumores em animais e mutação em bactérias (CARUSO; ALABUDA, 2008).

Diversos métodos analíticos têm sido desenvolvidos para a extração e determinação de HPAs em alimentos. Entre os métodos atualmente usados para extrair HPAs destacam-se as técnicas de Soxhlet e a dispersão da matriz em fase sólida (DMFS). E como técnica de identificação e quantificação a cromatografia gasosa com detector de espectrômetro de massas (CG-EM) é a mais utilizada. Para que estes métodos garantam bons resultados é necessário também, realizar uma validação. Segundo a Agência Nacional de Vigilância

Sanitária (ANVISA, 2003), a validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. De acordo com o Instituto Nacional de Metrologia (INMETRO, 2007), a validação é a comprovação, através do fornecimento de evidência objetiva, de que os requisitos para uma aplicação ou uso específicos pretendidos foram atendidos.

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo principal estudar a extração de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPAs) em dois tipos de frutos: o caju (*Anacardium occidentale*) e o tomate (*Lycopersicon esculentum*), utilizando-se diferentes técnicas. Para tal, fez necessário:

- a) Coletar e liofilizar o material a ser analisado;
- b) Extrair os HPAs das amostras estudadas por diferentes métodos;
- c) Validar a metodologia utilizada, em termos de fidelidade, faixa de linearidade, limite de detecção e limite de quantificação;
- d) Identificar os analitos de interesse;
- e) Estabelecer as condições cromatográficas adequadas para determinar os HPAs;
- f) Determinar a eficiência de recuperação na extração de HPAs das amostras analisadas.

As amostras escolhidas para estudo foram de frutos representativos da região Nordeste, notadamente do Estado do Ceará.

As técnicas Soxhlet e DMFS (dispersão da matriz em fase sólida) foram utilizadas para promover a extração dos HPAs. As análises de identificação e quantificação destes foram realizadas por cromatografia gasosa com detecção de massas (CG-EM). A seleção dessas técnicas foi em função do custo, facilidade na operação, consumo de material e tempo, sendo que estes procedimentos experimentais apresentam vantagens e desvantagens e a seleção dos alimentos foi devida seu alto consumo pela população cearense.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Produtos Naturais e Biotecnologia (LPNBio) do Departamento de Química Orgânica da Universidade Federal do Ceará, em parceria com o Laboratório de Contaminantes Orgânicos (LaCO_r – LABOMAR) e o Laboratório Análise de Traços (LAT UFC).

Espera-se que o desenvolvimento desta pesquisa possa contribuir com o desenvolvimento de metodologias relacionadas ao estudo de recuperação de HPAs em alimentos. Dado o caráter mutagênico e carcinogênico destes compostos, faz-se necessário uma ampla investigação para controle dos mesmos em produtos alimentícios.

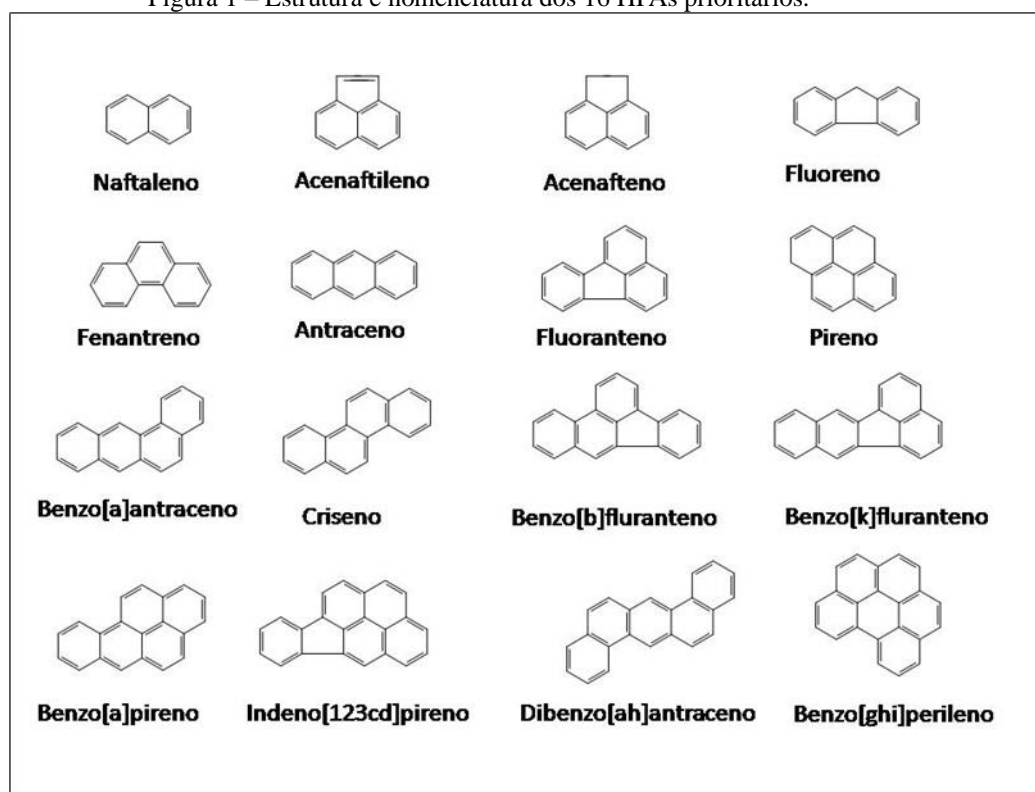
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são um grupo de compostos químicos que são tóxicos para os diversos organismos no ambiente, incluindo os seres humanos. Esses compostos constituem uma grande classe de compostos orgânicos caracterizados pela estrutura de carbono e hidrogênio, que formam de dois ou mais anéis aromáticos fundidos (BOLANOS *et al.*, 2010; PAYANAN *et al.*, 2013).

Os HPAs que apresentam entre 4 e 6 anéis aromáticos são altamente mutagênicos e carcinogênicos, enquanto que os de 2 e 3 anéis aromáticos, apesar de menos mutagênico, são altamente tóxicos (NETTO *et al.*, 2002). A Agência Proteção Ambiental Americana (USEPA, 1996) sugere o monitoramento dos chamados 16 HPAs prioritários, como apresentados na Figura 1.

Figura 1 – Estrutura e nomenclatura dos 16 HPAs prioritários.



Fonte: Agência Proteção Ambiental Americana (1996).

A contaminação de alimentos por HPAs pode ocorrer por certos tipos de processamento como defumação, torrefação e secagem direta com madeira, poluição do ar e

da água e a sua presença em solos terrestres e marinhos (TFOUNI *et al.*, 2007a; SALGUEIRO *et al.*, 2008). As categorias de alimentos que podem ser contaminados por HPAs são: água, vegetais, frutas, cereais, óleos vegetais, produtos lácteos, produtos defumados, chá, café, alimentos de origem marinha e alimentos grelhados (CAMARGO; TOLEDO, 2003; TFOUNI *et al.*, 2007b).

Em hortaliças e frutas, a presença de HPAs origina principalmente pela deposição de partículas de poluição do ar em suas superfícies (CAMARGO; TOLEDO, 2003). Portanto, os níveis de HPAs em alimentos dependem da fonte de aquecimento, temperatura, do material particulado gerado durante a combustão, e sobre o tipo de métodos de processamento (KUMARI, 2012).

2.2 HPAs em alimentos

Pesquisa na literatura nos últimos 20 anos, fazendo uso da ferramenta de busca *ScienceDirect*, gerou os dados que são apresentados na Tabela 1 com os tipos de alimentos que podem conter HPAs e as técnicas de extração mais utilizadas e os HPAs encontrados em cada matriz.

Tabela 1 – HPAs identificados em alimentos nos últimos 20 anos.

ALIMENTO	EXTRAÇÃO	REFERÊNCIA
200 alimentos	Saponificação	KAZEROUNI <i>et al.</i> , 2001
Água	Microextração em fase sólida	EL-BEQQALI <i>et al.</i> , 2006 WANG <i>et al.</i> , 2009
Alimentos Cozidos	Fase sólida	GOSETTI <i>et al.</i> , 2011
Alimentos grelhados	Ultrassom	VIEGAS <i>et al.</i> , 2012
Alimentos Infantis	Ultrassom	CIECIERSKA; OBIEDZINSKI, 2010
Arroz	Acelerada com solvente	TAO <i>et al.</i> , 2006
Carne de porco e vegetais	Líquido-líquido	DING <i>et al.</i> , 2012 DING <i>et al.</i> , 2013
Bivalves	Soxhlet	GARCIA <i>et al.</i> , 2004

Continuação da Tabela 1 – HPAs identificados em alimentos nos últimos 20 anos.

ALIMENTO	EXTRAÇÃO	REFERÊNCIA
Cachaça	Líquido-líquido	TFOUNI <i>et al.</i> , 2007b
Café	Líquido-líquido	TFOUNI <i>et al.</i> , 2013
Café	Fase sólida	FALCON <i>et al.</i> , 2005 ORECCHIO <i>et al.</i> , 2009
Caldo de cana	Saponificação	TFOUNI <i>et al.</i> , 2009
Cana de açúcar	Saponificação	TFOUNI <i>et al.</i> , 2007a
Carne	Microextração	LIU <i>et al.</i> , 2011
Carne	Saponificação	WRETLING <i>et al.</i> , 2010 ROSEIRO <i>et al.</i> , 2011 SANTOS <i>et al.</i> , 2011 CHUNG <i>et al.</i> , 2011 CHEN; CHEN 2005 PURCARO <i>et al.</i> , 2009 VIEGAS <i>et al.</i> , 2012
Carne assada	Microondas e Ultrassom	PURCARO <i>et al.</i> , 2009 VIEGAS <i>et al.</i> , 2012
Carne de churrasco (porco, bovina e frango)	Líquido pressurizado	AASLYNG <i>et al.</i> , 2013
Carne defumada	Acelerada por solvente	DJINOVIC <i>et al.</i> , 2008
Carne defumada	Líquido-líquido	SIMKO <i>et al.</i> , 2002 VIKSNA <i>et al.</i> , 2008
Carne Grelhada	Fase sólida	FARHADIAN <i>et al.</i> , 2010 FARHADIAN <i>et al.</i> , 2011
Carne, peixes, crustáceos, vegetais, frutas, ovo, leite, produtos lácteos, cereais, leguminosas, óleos e gorduras.	Líquido Pressurizado	MARTORELL <i>et al.</i> , 2010
Cereais Tostados	Microondas	HERNÁNDEZ <i>et al.</i> , 2012
Cereais, Vegetais, hortaliças e frutas.	Saponificação	DE VOS <i>et al.</i> , 1990

Continuação da Tabela 1 – HPAs identificados em alimentos nos últimos 20 anos.

ALIMENTO	EXTRAÇÃO	REFERÊNCIA
Chá	Extração sortiva em barra de agitação	ZUIN <i>et al.</i> , 2005
Chá	Ultrassom	LIN <i>et al.</i> , 2005
Chá e produtos secos	Microextração em fase sólida	ISHIZAKI <i>et al.</i> , 2010 LOH <i>et al.</i> , 2013
Chouriço	Ultrassom	LORENZO <i>et al.</i> , 2010
Costeletas de carneiro, Pés de galinha, Costeletas de porco, Carne de porco Salsichas.	Saponificação	SAINT -AUBERT <i>et al.</i> , 1992
Leite	Líquido-líquido	KISHIKAWA <i>et al.</i> , 2003
Leite	Fase sólida	NACCARI <i>et al.</i> , 2011 ZHANG <i>et al.</i> , 2012
Leite	Líquido-líquido e Fase sólida	CHUNG <i>et al.</i> , 2010
Leite	Ultrassom	SALGUEIRO <i>et al.</i> , 2009
Leite	Microextração em fase sólida	AGUINAGA <i>et al.</i> , 2007 BIANCHI <i>et al.</i> , 2008
Lula	Microondas	GOMES <i>et al.</i> , 2013
Manteiga, frutos do mar, carne, frango, gado e peixes	Ultrassom	LOUTFY <i>et al.</i> , 2007
Mel	Líquido pressurizado	LAMBERT <i>et al.</i> , 2012
Mexilhões	Líquido-líquido	SERPE <i>et al.</i> , 2010
Mexilhões	Microextração em fase sólida	FALCO <i>et al.</i> , 2008
Mexilhões, Peixe, Camarão e Caranguejos	Microondas	BAUMARD <i>et al.</i> , 1998

Continuação da Tabela 1 – HPAs identificados em alimentos nos últimos 20 anos.

ALIMENTO	EXTRAÇÃO	REFERÊNCIA
Milho, girassol, óleo comestível, carne de churrasco e peixe.	Saponificação e extração líquido-líquido	DOST; IDELI, 2012
Óleo de bagaço de azeitona	Líquido-líquido	DILETTI <i>et al.</i> , 2005
Óleo comestível	Ultrassom	WANG; GUO, 2010
Óleo comestível	Fase sólida	BARRANCO <i>et al.</i> , 2003 PAYANAN <i>et al.</i> , 2013
Óleos comestíveis	Líquido-líquido	WU; YU, 2012
Óleos de oliva e bagaço de azeitona	Acelerada com solvente	BALLESTEROS <i>et al.</i> , 2006
Óleo vegetal	Microextração em fase sólida	PURCARO <i>et al.</i> , 2007
Óleo vegetal	Fluido supercrítico	YUSTY; DAVINA 2005
Óleos Vegetais	Fase sólida	DRABOVA <i>et al.</i> , 2013
Óleos Vegetais	Líquido-líquido	CIECIERSKA; OBIEDZINSKI, 2013
Organismos marinhos (Peixe, crustáceos, e bivalves)	Saponificação	PERUGINI <i>et al.</i> , 2007
Pão	Saponificação	ORECCHIO; PAPUZZA, 2009
Pão	Sólido-líquido	SALGUEIRO <i>et al.</i> , 2008
Pão	Soxhlet	AHMED <i>et al.</i> , 2000
Pato	Saponificação	LIN <i>et al.</i> , 2011 PENA <i>et al.</i> , 2006 RAMALHOSA <i>et al.</i> , 2012a
Peixe	Microondas	RAMALHOSA <i>et al.</i> , 2012b ZHANG <i>et al.</i> , 2010 MOHAMMADI <i>et al.</i> , 2012 MOHAMMADI <i>et al.</i> , 2013

Continuação da Tabela 1 – HPAs identificados em alimentos nos últimos 20 anos.

ALIMENTO	EXTRAÇÃO	REFERÊNCIA
Peixe	Microondas	PENA <i>et al.</i> , 2006 RAMALHOSA <i>et al.</i> , 2012a RAMALHOSA <i>et al.</i> , 2012b ZHANG <i>et al.</i> , 2010 MOHAMMADI <i>et al.</i> , 2012 MOHAMMADI <i>et al.</i> , 2013
Peixe	Líquido Pressurizado	LUND <i>et al.</i> , 2009
Peixe	Microextração em fase sólida	GONÇALVES <i>et al.</i> , 2008
Peixe	Dispersão em matriz sólida	PENSADO <i>et al.</i> , 2005
Peixe	Saponificação	YAKBOOB <i>et al.</i> , 1993
Peixe, crustáceos e caranguejos	Ultrassom	GOMES <i>et al.</i> , 2010pu
Peixes e camarões	QuEChERS	KALACHOVA <i>et al.</i> , 2011
Porco	Fase sólida	JANOSZKA, 2011
Rações	Líquido-líquido	PIMENTEL <i>et al.</i> , 2012
Rapadura	Ultrassom	SILVA <i>et al.</i> , 2011
Repolho	Acelerada com solvente	TAO <i>et al.</i> , 2006
Repolho, Cenoura, Alho-porro e Escarola	Soxhlet Ultrassom	VOUTSA; SAMARA, 1998 KIPOPOULOU <i>et al.</i> , 1999
Salmão, óleo, mexilhão, peito de pato, conhaque, alcachofra, salsicha, vinho, peixe	Líquido pressurizado	VEYRAND <i>et al.</i> , 2007
Salsinha	Ultrassom	LORENZO <i>et al.</i> , 2011

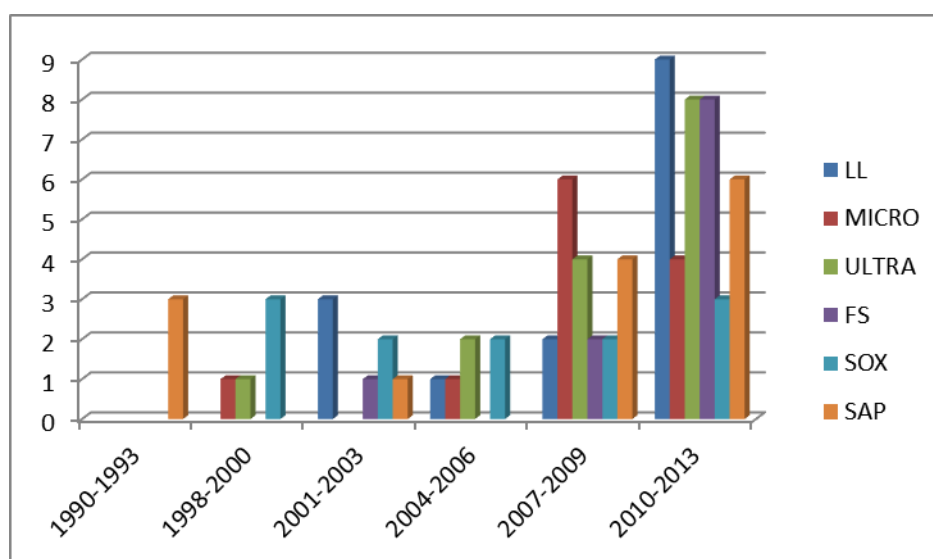
Continuação da Tabela 1 – HPAs identificados em alimentos nos últimos 20 anos.

ALIMENTO	EXTRAÇÃO	REFERÊNCIA
Suplemento alimentar	Ultrassom	DANYI <i>et al.</i> , 2009
Vegetal (Alface)	Soxhlet	KHAN <i>et al.</i> , 2008
Vegetais	Ultrassom	KHILLARE <i>et al.</i> , 2012
Vegetais	Fase sólida	SALGUEIRO <i>et al.</i> , 2008
Vegetais	Aceleraca com solvente	TAO <i>et al.</i> , 2004
Vegetais e frutas	Liquido-líquido	CAMARGO; TOLEDO, 2003

Fonte: O Autor

A Figura 2 apresenta a evolução das técnicas extrações mais utilizadas no período de 1990 a 2013. A técnica de saponificação (sap) vem sendo utilizada desde 1990 e continua até a atualidade. Observa-se, também, com o decorrer dos anos outras técnicas foram introduzidas, tais como: microextração (micro), Soxhlet (sox) e ultrassom (ultra). Na atualidade tem-se a utilização das seis técnicas citadas na Figura 2, sendo que a extração liquido-liquido é a que mais se destaca.

Figura 2 - Relação das técnicas de extração com os anos de publicação.

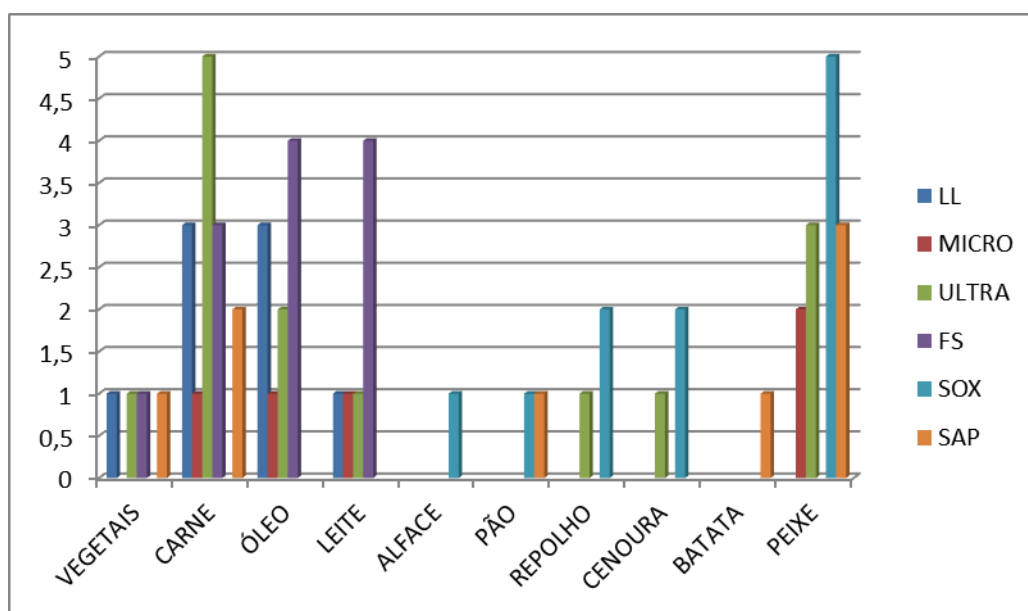


Fonte: O Autor

A Figura 3 mostra que a extração dos HPAs em vegetais pode ser realizada por

cinco técnicas diferentes, sendo que Soxhlet é a mais utilizada. Nas amostras de carne também são utilizadas cinco técnicas diferentes, sendo que a mais utilizadas é por ultrassom, e na extração por fase sólida é mais utilizada nas amostras de óleo e leite. Pode-se observar, também, que nas amostras de peixe a técnica de extração em destaque é por Soxhlet. Portanto, os dados analisados, mostram que a natureza da matriz é um dos fatores que influencia na seleção adequada da técnica de extração.

Figura 3 - Relação das técnicas de extração em função dos diferentes tipos de alimentos.



Fonte: O Autor

2.3 Métodos de extração

A preparação das amostras e o *clean-up* são pontos essenciais na análise de compostos provenientes de matrizes sólidas (CAVALCANTE, 2007), principalmente na determinação de analitos com baixas concentrações em matrizes complexas (REZAEI *et al.*, 2010).

Na literatura foi possível encontrar uma variedade de técnicas de extração para determinar HPAs em alimentos. Dentre as mais utilizadas estão a extração por: ultrassom, fase sólida, líquido-líquido, micro-ondas, saponificação, Soxhlet e microextração em fase sólida (Tabela 1).

Nesse trabalho foram comparadas as técnicas de Soxhlet e dispersão da matriz em fase sólida para avaliar a eficiência de extração dos 16 HPAs prioritários em amostras de alimentos.

2.3.1 Extração por Soxhlet

A extração por Soxhlet é o método recomendado pela USEPA para a extração de compostos orgânicos semi-voláteis e não voláteis de matrizes sólidas (USEPA, 1996). Segundo Cavalcante (2007), apesar da alta eficiência dessa técnica tem-se como desvantagens: tempo dispensado, excessivo consumo de água, consumo de cartucho de celulose, gasto de energia e a possibilidade de uma única amostra por vez.

Na extração por Soxhlet pode-se utilizar um solvente ou combinação destes. Segundo Quinte (2005), normalmente os analitos extraídos devem possuir maior ponto de ebulição que o solvente de extração, assim, são concentrados no balão enquanto o solvente puro irá recircular. Desta forma, assegura-se que somente o solvente puro será utilizado para extrair os analitos da amostra.

2.3.2 Extração por dispersão da matriz em fase sólida

De acordo com a literatura os métodos usados para determinar HPAs em alimento são baseados na extração com solvente, seguido por etapas de *clean up*. Mas, a partir de 1989 surgiu uma metodologia, que foi introduzida por Barker e colaboradores, que é empregada em análise de matrizes complexas. Essa metodologia consiste na dispersão da matriz em fase sólida (DMFS), pois agrupa em uma única etapa a extração e o *clean up* dos extratos. Segundo Dórea e Lopes (2004), essa técnica combina diretamente a amostra com um adsorvente (dispersante), permitindo a realização simultânea de várias etapas no preparo da amostra.

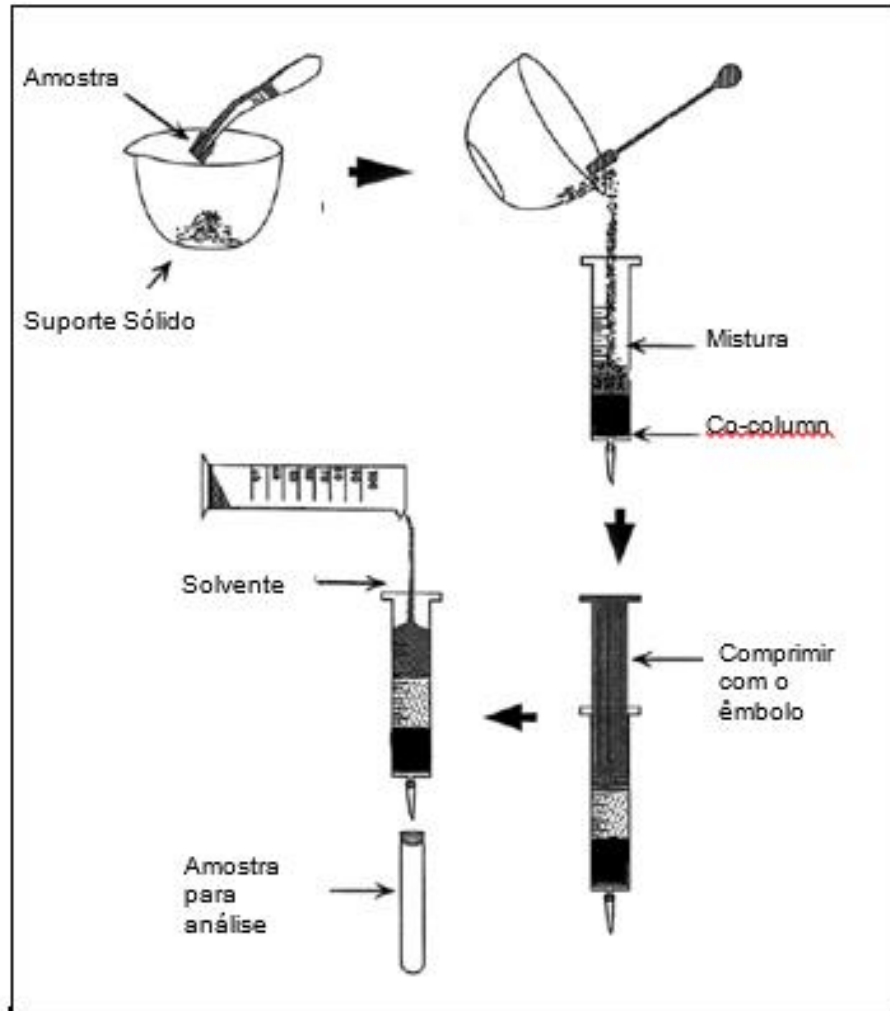
De acordo com Pinho *et al.* (2009), esta técnica baseia-se na dispersão da amostra sólida ou semi-sólida em um adsorvente, geralmente florisil ou octadecil (C-18). Além destes adsorventes, têm sido utilizadas também sílica e octil (C-8) na extração de contaminantes em alimentos.

Segundo Dórea e Lopes (2004), essa técnica consiste basicamente em introduzir a amostra em um recipiente contendo um suporte sólido (adsorvente), misturar até homogeneização, transferir o material (matriz e adsorvente) para a coluna e eluir com solvente apropriado. A coluna DMFS consiste, portanto, da matriz dispersa no adsorvente. A Figura 4 mostra o procedimento de dispersão da matriz em fase sólida.

Na verdade, este método é baseado em vários princípios simples de química e física, envolvendo forças aplicadas à amostra através de mistura mecânica para produzir

ruptura completa da amostra e das interações da matriz da amostra com um suporte sólido ligado fase (SPE) ou a química da superfície de outros materiais de suporte sólidos (BARKER, 2007).}}

Figura 4 - Etapas de extração DMFS



Fonte: Barker (2007).

2.3.3 Extração por QuEChERS

Anastassiades *et al.* (2003), com o objetivo de superar as limitações práticas dos métodos de extração existentes, na época introduziram um novo procedimento de preparo da amostra para extração de resíduos denominado QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Easy, Rugged, Safe*) sendo que a pronúncia, de acordo com os autores, deve ser “*cachers*” (MAJOR, 2007). Esse método tem como vantagem ser rápido, fácil, barato, eficaz, robusto e

seguro (PRESTES, 2011) e tem como aplicação análise multiresíduos em frutas e produtos hortícolas (LEHOTAY, 2010).

Esse método é baseado em uma extração com acetonitrila, seguida de partição líquido-líquido (adição de $MgSO_4$ e $NaCl$) e posterior etapa de purificação com extração em fase sólida dispersiva (RODRIGUES, 2011).

Para evitar o uso de co-solventes, que muitas vezes são tóxicos e caros, uma série de experimentos foram realizados durante o desenvolvimento do método QuEChERS com a adição de vários sais que eram destinados a induzir a separação de fases. Entre os vários sais testados, sulfato de magnésio anidro mostrou-se eficaz, reduzindo o volume da fase aquosa e facilitando a partição de analitos polares para a fase orgânica produzindo maior recuperação (ANASTASSIADES *et al.*, 2003). O uso de acetonitrila como solvente de extração proporciona uma menor quantidade de co-extrativos lipofílicos provenientes da amostra (PRESTES, 2011).

2.4 Validação da metodologia

A validação da metodologia é necessária devido à importância da medida analítica, garantindo que os resultados obtidos sejam consistentes, que os custos sejam justificados e que as decisões baseadas nesses resultados possam ser tomadas com confiança. A necessidade de se mostrar a qualidade de medições químicas, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade está sendo cada vez mais reconhecida e exigida. Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve passar por uma validação (RIBANI *et al.*, 2004).

A validação é a confirmação pelo exame e fornecimento de provas objetivas para que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido sejam satisfeitos. A validação de um método é um processo que estabelece as características de desempenho e limitações do método e indica quais analitos podem ser determinados, em quais matrizes e na presença de quais interferentes (INMETRO, 2003).

O processo de validação é baseado na determinação de características de desempenho do método: exatidão, precisão, repetibilidade, reprodutibilidade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, robustez e seletividade. Apesar de existirem várias organizações nacionais e internacionais que definem estes conceitos, não existe um consenso de quais parâmetros aplicarem e nem tampouco um procedimento único e normatizado que estabeleça como executar a validação de métodos instrumentais de separação. Grande parte

dos trabalhos considera que os parâmetros essenciais para a validação de um método analítico são: faixa de linearidade, repetibilidade, reprodutibilidade, recuperação, limite de detecção e limite de quantificação (LANÇAS, 2004).

2.4.1 Fidelidade

Segundo Lanças (2004), a fidelidade expressa o grau de dispersão entre uma série de medidas obtidas de ensaios múltiplos em uma mesma amostra homogênea em determinadas condições.

2.4.1.1 Repetibilidade

Segundo Ribani *et al.* (2004) e Lanças (2004), a repetibilidade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método sob as mesmas condições de medição (a mesma amostra, o mesmo laboratório, o mesmo operador, o mesmo equipamento e em um curto intervalo de tempo).

Em análise cromatográfica é importante conhecer a repetibilidade de pelo menos dois parâmetros: o tempo de retenção e área ou altura do pico. A repetibilidade do tempo de retenção é importante devido, na maioria das análises cromatográficas, ela é usada para confirmar a identidade do composto (análise qualitativa) e no caso da repetibilidade da área ou altura do pico, é importante por ser um parâmetro utilizado na quantificação dos compostos de interesse (análise quantitativa) (LANÇAS, 2004).

A repetibilidade por ser expressa através do desvio padrão ou coeficiente de variação, como mostra a Equação 1:

$$S^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1} \quad (1)$$

Em que:

X_i = Valor medido

$(X_i - \bar{X})^2$ = Média das medidas

n = número de medidas

S^2 = Variância

A raiz quadrada da variância é denominada de desvio padrão, representada por S,

como mostra a Equação 2:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (2)$$

O INMETRO recomenda para a que ocorra a repetibilidade são necessários sete ou mais repetições para o cálculo do desvio padrão. E a ANVISA recomenda que a repetibilidade seja verificada a partir de nove determinações (três níveis e três repetições cada um).

2.4.1.2 Fidelidade Intermediária

Segundo Lanças (2004), a fidelidade intermediária refere-se as variações ocorridas dentro de um mesmo laboratório quando um ou mais fatores importantes são mudados (dia e/ou analista e/ou aparelhagem). A fidelidade intermediária pode ser expressa através do desvio padrão ou coeficiente de variação Equações 1 e 2.

2.5.4 Linearidade

A linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. Recomenda-se que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, cinco concentrações diferentes (ANVISA, 2003).

Segundo Lanças (2004), deve-se construir um gráfico que relaciona a resposta de equipamento em função de várias concentrações do analito em estudo. Essa relação pode ser expressa como uma equação da reta chamada de curva analítica. A equação matemática tem como forma (Equação 3):

$$y = ax + b \quad (3)$$

y é a variável dependente que corresponde à resposta instrumental, relacionada com a altura ou área do pico cromatográfico.

x é a variável independente e está relacionada com as concentrações do padrão analítico da substância de interesse.

a e b são coeficientes linear e angular, respectivamente.

Segundo Ribani *et al.* (2004), a partir dos pontos experimentais é possível calcular os coeficientes de regressão (a e b) e também o coeficiente de correlação (r). Este parâmetro permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0 menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão linear.

A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o INMETRO um valor acima de 0,90.

2.5.3 Limite de detecção (LD)

O limite de detecção é a menor concentração da substância em um exame, que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada utilizando um determinado procedimento experimental (INMETRO, 2003). Na prática, o LD é determinado como a menor concentração de um analito que pode ser diferenciada com segurança de um ruído do sistema (Lanças, 2004).

Segundo Ribani (2004) e Brito *et al.* (2003), o limite de detecção pode ser calculado pela uma equação matemática, tendo como base a curva analítica. O LD pode ser expresso como (Equação 4):

$$LD = \frac{2N}{S} \quad (4)$$

Em que N é a estimativa do desvio padrão da resposta dos brancos e S coeficiente angular da curva analítica.

2.5.4 Limite de quantificação (LQ)

O limite de quantificação do método analítico é a menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de precisão e exatidão, sob determinadas condições experimentais (INMETRO, 2003). O LQ pode ser expresso por uma equação matemática (BRITO *et al.*, 2003; LANÇAS, 2004), como mostra a Equação 5:

$$LQ = \frac{10s}{S} \quad (5)$$

Em que: s é o desvio padrão das respostas dos brancos e S é o coeficiente angular da equação da reta.

2.5.7 Recuperação

Os estudos de recuperação são componentes essenciais da validação e da utilização de todos os métodos analíticos. A recuperação é a relação da concentração do analito adicionado no início com a concentração obtida no final da extração (IUPAC, 2002). Segundo Lanças (2004) é uma medida da eficiência na análise que envolve um grande número de passos (extração, *clean up* entre outros).

Para avaliar a recuperação de matrizes ambientais são utilizados padrões *surrogates*. Estes são denominados como compostos orgânicos incomuns na natureza ou nas amostras em análise, porém quimicamente e fisicamente semelhantes aos analitos. A recuperação dos padrões *surrogates* é uma forma de controle metodológico na qual é possível estimar perdas ou ganhos durante o procedimento global de análise (BERTHOUEX; BROWN, 2002; LANÇAS, 2004).

O cálculo da recuperação de um padrão *surrogate* é feita de uma maneira indireta, através da adição de um padrão interno cromatográfico (PICG). Considerando que o PICG adicionado no final da extração do processo e não sofreu perdas, a relação da quantidade de PICG e *surrogate* possibilita calcular a recuperação do *surrogate* (MARTINS, 2005).

3 MATERIAS E MÉTODOS

3.1 Coleta e Origem

As amostras de caju (2,00 Kg) e tomate (3,00 Kg) utilizadas neste trabalho foram coletadas no dia 06 de outubro de 2012 na Central de Abastecimento do Ceará (CEASA) localizada Av. Dr. Mendel Steinbruch, S/N - Pajuçara, Maracanaú/CE.

As amostras tem como origem dois lugares diferentes: amostra de caju tem como origem o município de Beberibe (CE) e o tomate o município de Tianguá (CE).

3.2 Solventes e Reagentes

Todos os reagentes utilizados apresentavam pureza analítica (PA). Na Tabela 2 são apresentadas as procedências de todos os reagentes utilizados, bem como as respectivas fórmulas químicas.

Tabela 2 - Procedência dos reagentes utilizados.

Reagentes	Fórmula Química	Procedência
Hexano (grau HPLC)	C ₆ H ₆	Tedia
Diclorometano (grau HPLC)	CH ₂ Cl ₂	Tedia
Acetato de sódio	CH ₃ COONa	Tedia
Sulfato de Sódio Anidro	Na ₂ SO ₄	Tedia
Alumina	Al ₂ O ₃	Vetec

Fonte: O Autor

Foi utilizada uma solução com 16 padrões de HPAs em acetonitrila da Sigma-Aldrich (USA), apresentando entre 99,5 e 99,9 % de pureza. As concentrações das soluções de HPAs utilizadas nesse trabalho foram de: 20 µgL⁻¹, 50 µgL⁻¹ e 100 µgL⁻¹. Os HPAs contidos na solução foram: Acenafteno (ACE), Acenaftileno (ACY), Antraceno (ANT), Benzo[a]antraceno (BaA), Benzo[b]fluoranteno (BbF), Benzo[k]fluoranteno (BkF), Benzo[g,h,i]perileno (BghiP), Benzo[a]pireno (BaP), Criseno (CRI), Dibenzo[a,h]antraceno (DahA), Fluoranteno (FLT), Fluoreno (FL), Indeno[1,2,3-c,d]pireno (INcdP), Naftaleno (NAF), Fenantreno (FEN), Pireno (PIR).

3.3 Limpeza das vidrarias

As vidrarias foram limpas com o detergente Extran (5 %, v/v) e enxaguados abundantemente com água destilada. Em seguida foram lavadas com acetona e mantidas por aquecimento a 250 °C, por no mínimo uma noite.

3.4 Liofilização

Inicialmente as amostras foram homogeneizadas em um processador de alimentos. As polpas obtidas foram liofilizadas no Laboratório de Análises para Certificação de Produtos do Caju (LABCAJU), localizado no Nutec (Núcleo de Tecnologia Industrial do Ceará) e no Parque de Desenvolvimento Tecnológico (Padetec). Estas liofilizadas foram utilizadas nas extrações por Soxhlet.

3.5 Extração de HPAs provenientes de materiais orgânicos

Após a liofilização das amostras foram realizadas as extrações por Soxhlet. Esta técnica executada no Laboratório de Análise de Contaminantes Orgânicos (LACOr) localizado no Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR) da Universidade Federal do Ceará.

3.5.1 Extração por Soxhlet

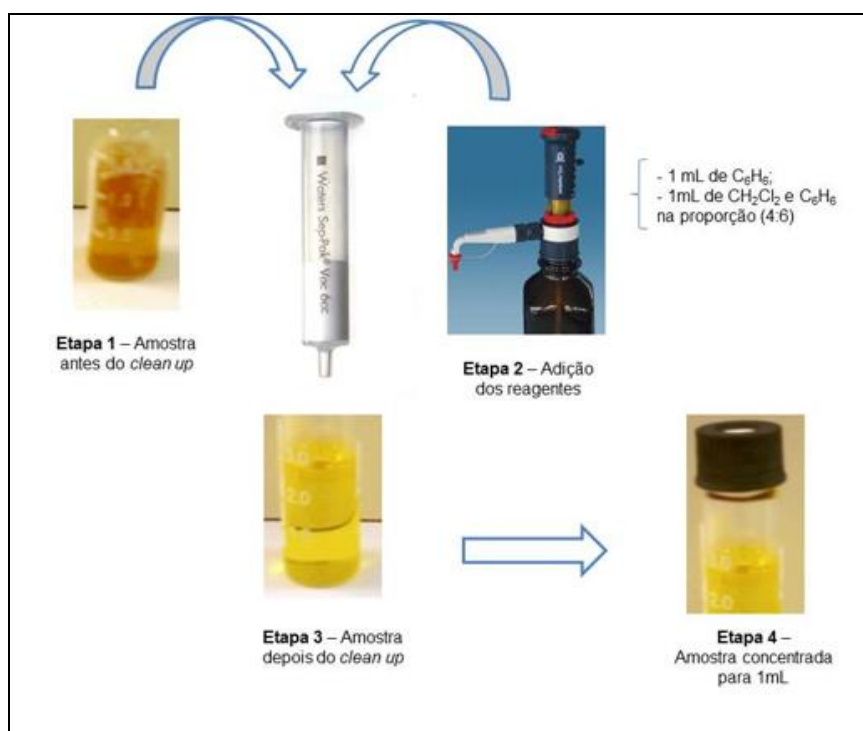
A extração por Soxhlet teve como base o trabalho desenvolvido por Kipopoulou e Samara (1999), na qual foram usados 5,0 g (em triplicata) de amostras secas (liofilizadas), e essas foram misturados com 1,0 g de sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) e dopado com os 16 HPAs prioritários pela US-EPA (nas seguintes concentrações: 20, 50 e 100 $\mu\text{g/L}$). O tempo de extração foi de quatro horas (4 ciclos/ hora). Os solventes utilizados foram diclorometano (CH_2Cl_2) e hexano (C_6H_6) na proporção de (1:1, v/v) em um volume de 200 mL. Foi, também, realizada a extração em triplicata das amostras sem a presença do padrão, sendo denominado como branco. E por fim, os extratos obtidos foram concentrados para 1 mL no equipamento rota evaporador e colocado o padrão interno.

3.5.2 Clean up

O *clean up* das amostras foi realizado nos cartuchos de Florisil da *Applied Separation* de 500 mg/6 mL.

Primeiramente as amostras foram colocadas no cartucho e em seguida o frasco que continha a amostra foi rinsado com 1,0 mL de hexano (C_6H_6). Em seguida, os extratos foram eluídos com diclorometano (CH_2Cl_2) e hexano na proporção (4:6) e, por fim, as amostras foram concentradas para 1.0 mL, como mostra a Figura 5.

Figura 5 – *Clean up* das amostras.



Fonte: O autor

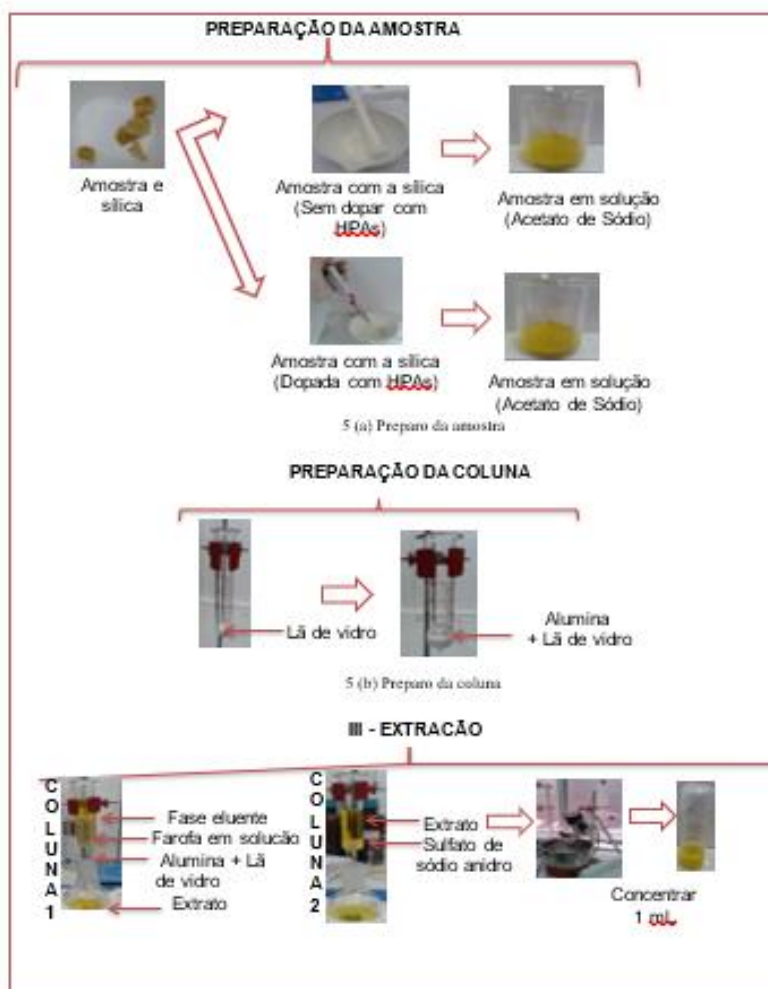
3.6 Dispersão da Matriz em Fase Sólida (DMFS)

A extração das amostras por dispersão da matriz em fase sólida (DMFS) teve como base o trabalho desenvolvido por Dórea e Lopes (2004), modificando alguns dados (massa da amostra e fase eluente) para obtenção de melhores resultados em termos de recuperação para os HPAs.

Após a coleta as amostras foram conservadas em um *freezer* e, no momento da extração as mesmas foram retiradas e deixadas à temperatura ambiente até descongelarem.

Após o descongelamento foram pesados 4 g de amostra, sendo, também, pesados os adsorventes: 4 g de sílica (70 – 230 mesh) e 1 g de alumina Vetec. Essa extração foi realizada em uma seringa de vidro de 5 mL sendo lã de vidro e a alumina colocados na base da seringa. Dando continuidade ao processo de extração, foi feita uma mistura da amostra com a sílica em um almofariz. Essa mistura foi transferida para um Becker e adicionado 20 mL de acetato de sódio. Depois, essa mistura foi transferida para uma seringa de vidro, que já continha a lã de vidro e a alumina (Figura 6). No Becker que continha a mistura (sílica e amostra) foram colocados 5 ml de acetato de sódio e depois transferidos para a seringa. Depois foram colocadas as fases eluentes: primeiro 5 mL de acetato de etila e depois 20 mL de uma mistura hexano e acetato de etila na proporção de 4:6. Foi acrescentada a esse procedimento experimental a passagem do extrato em uma coluna de sulfato de sódio para resquícius de água. E, por fim, o extrato foi concentrado para 1 mL.

Figura 6 - Etapas da extração: (a) preparo da amostra; (b) preparo da coluna e (c) extração por DMFS



3.7 Identificação dos analitos de interesse

Os HPAs analisados (analitos, padrão interno e *surrogates*) foram identificados através do tempo de retenção e espectros de massa obtidos a partir dos padrões autênticos. Os HPAs de interesse foram distribuídos em cinco grupos, de acordo com o tempo de retenção, peso molecular ou número de anéis benzênicos (Tabela 3), possibilitando utilização de HPAs deuterados para cada grupo correspondente como padrão *surrogate* para o cálculo da recuperação e quantificação destes analitos. Segundo Cavalcante (2007), esse padrão é um composto orgânico incomum na natureza ou na amostra em análise, porém quimicamente e fisicamente semelhante ao analito. O padrão *surrogate* foi utilizado para avaliar ou corrigir as perdas dos processos de extração.

O padrão interno utilizado neste trabalho foi o azobenzeno, pois é uma substância similar aos HPAs, e também, não estava presente no analito, apresentando tempo de retenção próximo aos HPAs. O padrão interno foi utilizado para minimizar os erros das análises cromatográficas.

Tabela 3 – HPAs de interesse com número de anéis, m/z (relação massa/carga), TR (tempo de retenção) e padrão *surrogate* correspondente.

COMPOSTO	ABREVIATURA	Nº ANÉIS	TR (min)	m/z	PADRÃO SURROGATE
Naftaleno	Naf	2	11,6	128	Naftaleno-d8 m/z 136 TR 11,5
		3	18,8	152	Acebafteno-d10
Acenafteno	Ace	3	19,4	153	m/z164
Fluoreno	Fl	3	21,8	166	TR 19,2
Fenantreno	Fen	3	26,2	178	Fenantreno-d10
Antraceno	Ant	3	26,4	178	m/z 188 TR 26,1
Fluoranteno	Flu	4	31,7	202	
Pireno	Pir	4	32,7	202	Criseno-d12
Benzo(a)antraceno	BaA	4	38,4	228	m/z 240
Criseno	Cri	4	38,5	228	TR 38,4
Benzo(b)fluoranteno	BbF	5	43,1	252	
Benzo(k)fluoranteno	BkF	5	43,2	252	
Benzo(a)pireno	BaP	5	44,3	252	Perileno-12
Perileno	Per	5	44,7	252	m/z 262
Indeno(123-cd)pireno	IncdP	6	48,4	276	TR 44,6
Dibenzo(ah)antraceno	DahA	5	48,6	278	
Benzo(ghi)perileno	BghiP	6	49,3	276	

Fonte: O Autor

3.8 Condições cromatográficas para determinação de HPAs

A quantificação de HPAs foi realizada utilizando cromatógrafo a gás (CG-MS), modelo QP2010-Shimadzu, interfaciado com detector de massa acoplado a uma coluna DB-5 J&W Scientific (30 m × 0,25 mm di × 0,25 µm de filme). As amostras foram injetadas no CG-MS no modo *Splitless*, utilizando hélio como gás de arraste, a um fluxo de 1,0 mL/min. A temperatura do injetor foi de 260 °C.

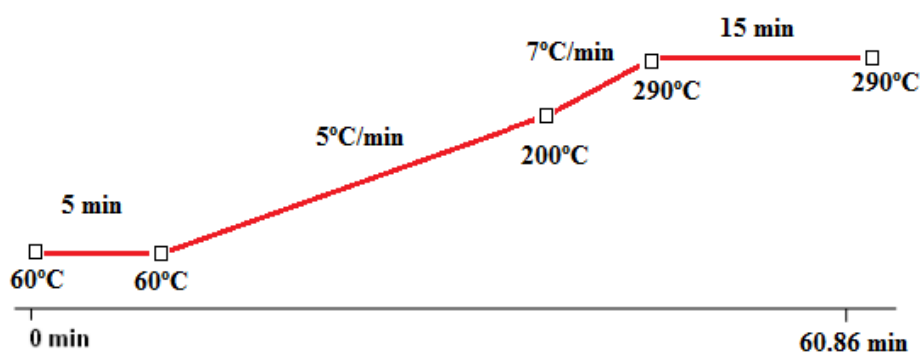
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Validação da metodologia cromatográfica

4.1.1 Programa de temperatura

As condições de temperatura do programa que melhor separou os HPAs em menor tempo foram: primeiro uma temperatura inicial de 60 °C mantida por 5 min. Nesta temperatura inicial tem-se a passagem da fase móvel pela coluna. Depois a temperatura foi elevada a 200 °C a uma taxa de 5 °C/min e finalmente aumentada para 290 °C a uma taxa de 7 °C/min. A corrida cromatográfica se deu por completa em 60 min conforme mostra o gráfico da Figura 7. O programa de temperatura é importante na cromatografia gasosa, pois melhora a separação e diminui o tempo de análise (COLLINS *et al.*, 2006).

Figura 7- Esquema do programa de temperatura de separação dos HPAs.



Fonte: Dados da pesquisa.

Segundo Collins *et al.* (2006) e Harris *et al.* (2005), o programa de temperatura deve iniciar entre 50 e 90 °C abaixo do ponto de ebulição dos compostos mais voláteis e terminar com uma temperatura acima do ponto de ebulição dos compostos menos voláteis. Deve-se evitar a decomposição dos analitos com a elevação da temperatura.

A programação da temperatura foi iniciada com uma temperatura baixa, para que os compostos de baixo ponto de ebulição pudessem eluir com picos separados. E depois foi aumentada gradativamente a temperatura da rampa para que fosse possível diminuir o tempo de retenção das substâncias de maior ponto de ebulição.

Esse programa de temperatura foi eficiente, pois permitiu a eluição dos analitos

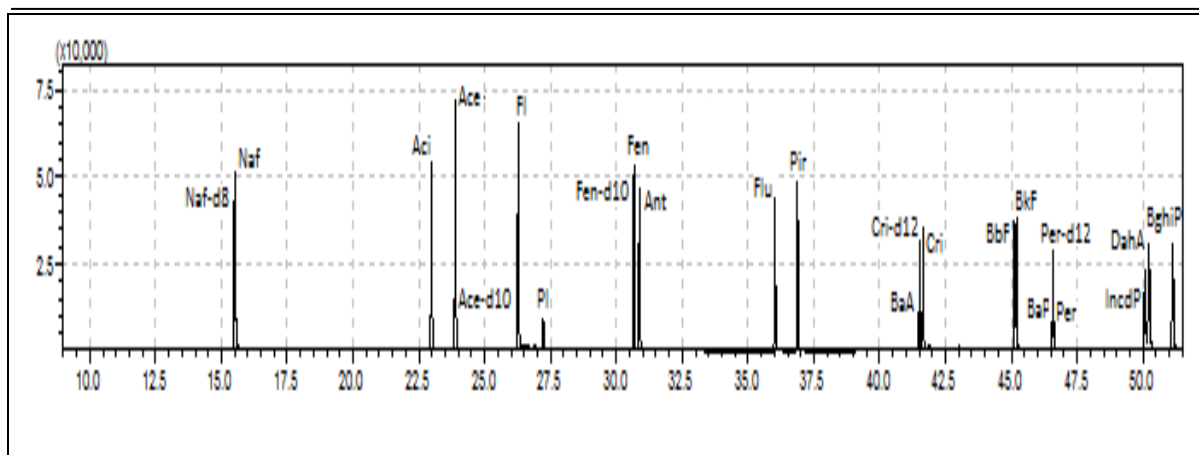
dentro de um prazo razoável, e pode-se ter certeza de que todos os analitos foram eluídos com uma boa simetria dos picos.

4.1.2 Identificação dos HPAs e confirmação dos tempos de retenção

Após a separação dos HPAs no CG-MS com o programa de temperatura (método já definido), foi realizada a identificação desses compostos pela ordem de eluição e os seus respectivos tempos de retenção pré-estabelecidos.

A identificação desses compostos também foi confirmada pela biblioteca NIST05. Essa biblioteca é uma ferramenta do detector de massa que através dela pode-se confirmar a massa molar do composto e a nomenclatura. Na Figura 8 estão os tempos de retenção dos compostos em estudo.

Figura 8 - Cromatograma de separação dos HPAs utilizando CG-MS.



Fonte: Dados da pesquisa

Como pode ser observado na Figura 8, a ordem de eluição dos HPAs são: Naf-d8 (Naftelno deuterado), Naf (Naftelno), Aci (Acenaftileno), Ace (Acenafteno), Ace-d10 (Acenafteno deuterado), Fl (Fluoreno), PI (Padrão Interno), Fen-d10 (Fenantreno deuterado), Fen (Fenantreno), Ant (Antraceno), Flu (Fluoranteno), Pir (Pireno), BaA (Benzo[a]antraceno, Cri-d12 (Criseno deuterado), Cri (Criseno), BbF (Benzo[b]fluoranteno, BkF (Benzo[k]fluoranteno, BaP (Benzo[a]pireno), Per-12 (Perileno deuterado), Per (Perileno), IncdP (Indeno[1,2,3-cd]pireno), DahA (Dibenzo[a,h]antraceno), Benzo[g,h,i]perileno.

4.2 Validação do método de análise de HPAs por CG-MS

4.2.1 Fidelidade

Na análise cromatográfica a repetibilidade foi calculada em dois parâmetros: o tempo de retenção e a área ou a altura do pico. A repetibilidade do tempo de retenção é utilizada para confirmar a identidade do composto, sendo uma análise qualitativa e no caso da repetibilidade da área ou altura do pico, é importante por ser um parâmetro utilizado na quantificação dos compostos de interesse (análise quantitativa) (LANÇAS, 2004). A fidelidade do tempo de retenção (em triplicata) foi estimada durante o período de análise em três ocasiões (exp. 1, exp. 2 e exp. 3) utilizando o tempo de retenção do azobenzeno (Tabela 4). No caso da repetibilidade da área (em triplicata), a fidelidade foi estimada da mesma forma (baseado na área do pico do azobenzeno).

Para a estimativa da fidelidade do método analítico, o cálculo do coeficiente de variação (CV) (Equação 6) não ultrapassou 10 %, enquanto que para a repetibilidade, o CV foi inferior a 1 %, os quais podem ser considerados valores satisfatórios (LANÇAS, 2004).

$$CV = \frac{s}{\bar{X}} \cdot 100 \quad (\text{Eq. 6})$$

Tabela 4 - Dados da estimativa da fidelidade através da repetibilidade do Padrão Interno (PI).

	ÁREA DO PICO			TEMPO DE RETENÇÃO		
	EXP 1	EXP 2	EXP 3	EXP 1	EXP 2	EXP 3
INJEÇÃO 1	20610	31701	30134	27222	27246	27251
INJEÇÃO 2	21013	34295	28470	27105	27208	27212
INJEÇÃO 3	21281	29341	34457	27195	27192	27256
MÉDIA	20968	31779	31020,3	27174	27215,3	27239,7
DP	337,76	2477,92	3090,35	61,2617	27,7369	24,0901
CV %	1,61	7,8	9,96	0,23	0,1	0,09

Fonte: Dados da pesquisa

4.2.2 Faixa linear de trabalho

Neste trabalho foram construídas curvas de calibração com os pontos: 0 (branco); 0,1; 10; 20; 200 e 500 μgL^{-1} cujos respectivos coeficientes de correlação ou coeficiente de Pearson (R) e as curvas analíticas estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Parâmetros utilizados na curva de calibração.

COMPOSTO	CURVAS ANALÍTICAS	R
Naftaleno	$y = 333,1x + 1383,8$	0,9989
Acenaftileno	$y = 303,16x + 1109,8$	0,9993
Acenafteno	$y = 392,57x + 1054,2$	0,9991
Fluoreno	$y = 348,74x + 1138,7$	0,9993
Fenantreno	$y = 277,67x + 1488,2$	0,9991
Antraceno	$y = 246,14x + 625,66$	0,9997
Fluoranteno	$y = 213,66x + 1093,8$	0,9994
Pireno	$y = 233,11x + 1284,7$	0,9994
Benzo[a]antraceno	$y = 141,74x + 2236,6$	0,9913
Criseno	$y = 156,58x + 3323,3$	0,9962
Benzo[b]fluoranteno	$y = 174,32x + 2373,6$	0,9961
Benzo[k]fluoranteno	$y = 187,88x + 1536,7$	0,9987
Benzo[a]pireno	$y = 144,24x + 614,82$	0,998
Indeno[1,2,3-cd]pireno	$y = 171,16x + 1123,6$	0,9922
Dibenzo[a,h]antraceno	$y = 243,07x + 1123,4$	0,9943
Benzo[g,h,i]perileno	$y = 247,38x + 99,857$	0,9969

Fonte: Dados da pesquisa.

Um coeficiente de correlação maior que 0,999 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão (SHABIR, 2003; JENKE, 1998; GREEN, 1996). A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o INMETRO um valor acima de 0,90. Neste trabalho os valores encontrados estão dentro do esperado de acordo com a ANVISA e o INMETRO (Tabela 5).

4.2.3 Limite de detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

O LD pode ser calculado de três maneiras diferentes: método visual, método relação sinal-ruído e método baseado em parâmetros da curva analítica, sendo o último utilizado neste trabalho. O limite de detecção pode ser expresso pela Equação 4.

O LQ é um parâmetro determinado, principalmente, para ensaios quantitativos, produtos de degradação e é expresso como concentração do analito na amostra. O limite de quantificação pode ser expresso a partir da Equação 5.

Neste trabalho o LD variou de 6,71 a 76,12 μgL^{-1} e o LQ de 22,36 a 253,73 μgL^{-1} (Tabela 6).

Tabela 6 -Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).

COMPOSTO	LD (μgL^{-1})	LQ (μgL^{-1})
Naftaleno	17,57	58,57
Acenaftileno	15,50	51,67
Acenafteno	17,95	59,83
Fluoreno	22,19	73,96
Fenantreno	17,29	57,62
Antraceno	11,73	39,12
Fluoranteno	6,71	22,36
Pireno	12,00	40,00
Benzo[a]antraceno	12,66	42,19
Criseno	36,66	122,19
Benzo[b]fluoranteno	76,12	253,73
Benzo[k]fluoranteno	19,63	65,42
Benzo[e]pireno	7,77	25,88
Benzo[a]pireno	14,94	49,80
Indeno[1,2,3-cd]pireno	20,28	67,60
Perileno	11,10	37,01
Dibenzo[a,h]antraceno	18,42	61,40
Benzo[g,h,i]perileno	28,96	96,54

Fonte: Dados da pesquisa.

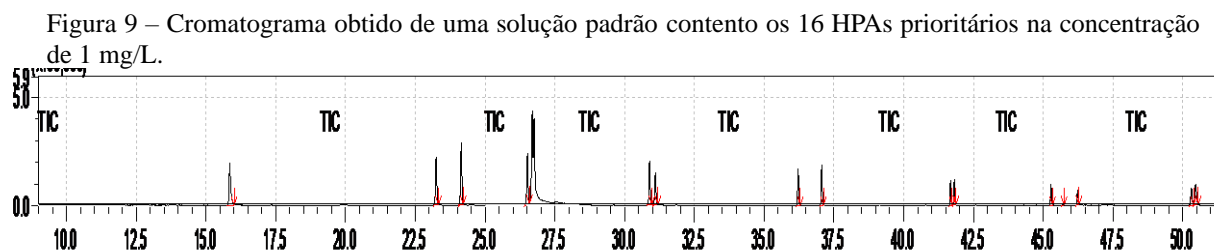
A literatura apresenta várias faixas de limite de detecção de HPAs. No trabalho de Hernandez *et al.* (2012), a extração de HPAs foi realizada em cereais torrados na qual foi encontrada uma faixa LD de 0.25 ng mL^{-1} a 42 ng mL^{-1} . Liu *et al.* (2011) encontraram um limite de detecção baixo ($1.4 - 2.0 \text{ } \mu\text{g/L}$), sendo aplicado para a determinação dos HPAs em amostras de carne defumada.

4.3 Extração por Soxhlet

Foram realizadas extrações por Soxhlet com o objetivo de obter o extrato de caju e tomate para análise. Após as extrações por Soxhlet optou-se pelo *clean up* das amostras utilizando o cartucho de florisil. Essa técnica é usada para limpar os extratos de clorofila e outras substâncias mais polares do que HAPs. Após o *clean up* as amostras apresentaram-se mais translúcida, sendo, portanto, aptas para injetar no cromatógrafo a gás com detector de massa.

4.4 Análise cromatográfica

A Figura 9 mostra o cromatograma do sistema CG/MS, o qual foi obtido pela injeção direta da mistura-padrão dos 16 HPAs. A separação dos 16 HPAs foi alcançada no tempo de 60 min.



Fonte: Dados da pesquisa.

Esse cromatograma foi obtido pelo modo SIM (*selected ion monitoring*). O detector de massa foi ajustado para que fossem apenas observados os íons de razão (m/z) dos 16 HPAs.

A Tabela 7 apresenta informações referentes ao cromatograma da Figura 9, tais como: o nome do composto, tempo de retenção e o íon molecular cada HPA da solução

padrão.

Tabela 7 – Nomenclatura dos 16 HPAs prioritários, tempo retenção e íon molecular.

COMPOSTO	TEMPO (min)	ION MOLECULAR
Naftaleno	15.847	128 e 118
Acenaftileno	23.249	152 e 151
Acenafteno	24.147	153, 162, 154 e 150
Fluoreno	26.520	165 e 82
Fenantreno	30.895	178, 152 e 179
Antraceno	31.101	178, 152 e 179
Fluoranteno	36.214	202 e 101
Pireno	37.065	202 e 101
Benzo[a]antraceno	41.677	228 e 113
Criseno	41.815	228 e 113
Benzo[b]fluoranteno	45.278	252 , 132, 126 e 264
Benzo[k]fluoranteno	45.699	252 , 132, 126 e 264
Benzo[a]pireno	46.231	252 , 132, 126 e 264
Indeno[1,2,3-cd]fluoranteno	50.310	276 e 138
Dibenzo[a,h]antraceno	50.462	278 e 139
Benzo[g,h,i]perileno	51.408	276 e 138

Fonte: Dados da pesquisa.

A partir das informações do cromatograma do padrão, pode-se ter um embasamento do tempo de retenção e dos íons moleculares de cada HPAs e, assim, foi possível identificar os HPAs nas amostras de caju e tomate analisadas pelos dois métodos de extrações.

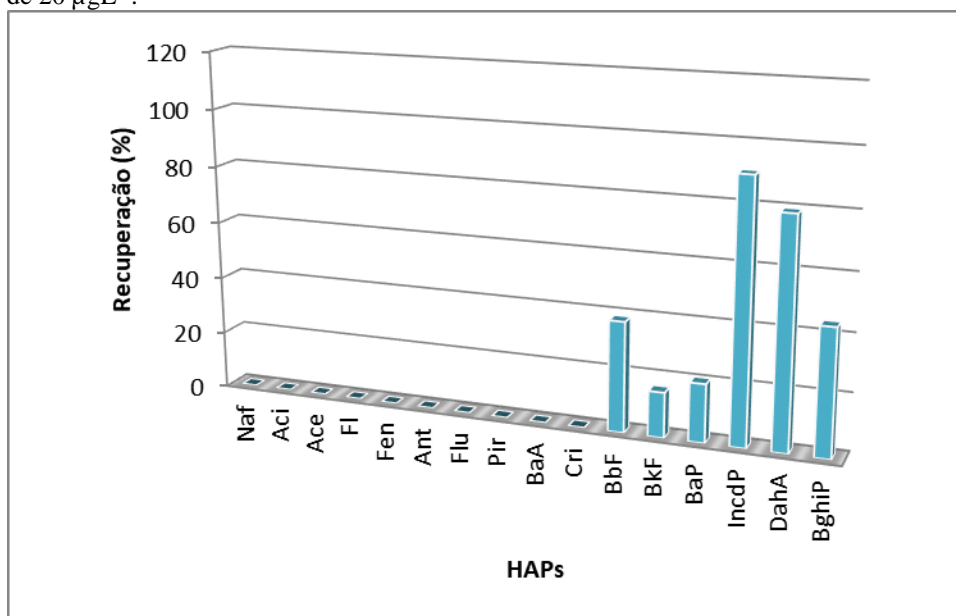
4.5 Extrações de HPAs provenientes de amostra de caju pelo método Soxhlet

A recuperação é definida como a proporção da quantidade de substância de interesse, presente ou adicionada no material analisado, que é passível de ser quantificada (RIBANI *et al.*, 2004). Então a eficiência foi calculada pela seguinte Equação 6:

$$R = ([\text{analito encontrado}] - [\text{Br}]) / [\text{analito adicionado}] * 100 \quad (6)$$

As eficiências de recuperação na extração de HPAs utilizando Soxhlet na concentração de $20 \mu\text{gL}^{-1}$ variaram de ND (não detectado) a 93 % (Figura 10).

Figura 10– Recuperações de HPAs utilizando soxhlet em amostras de caju na concentração de $20 \mu\text{gL}^{-1}$.

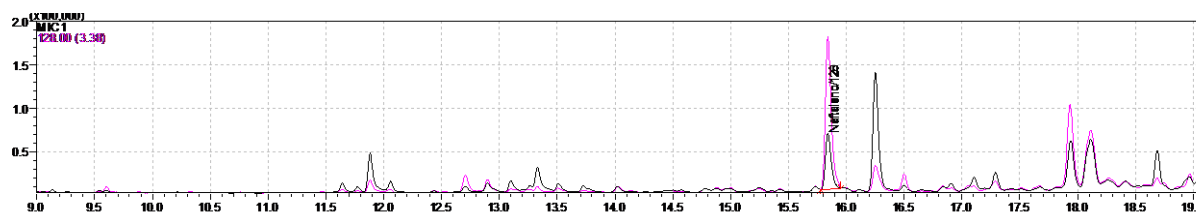


Fonte: Dados da pesquisa.

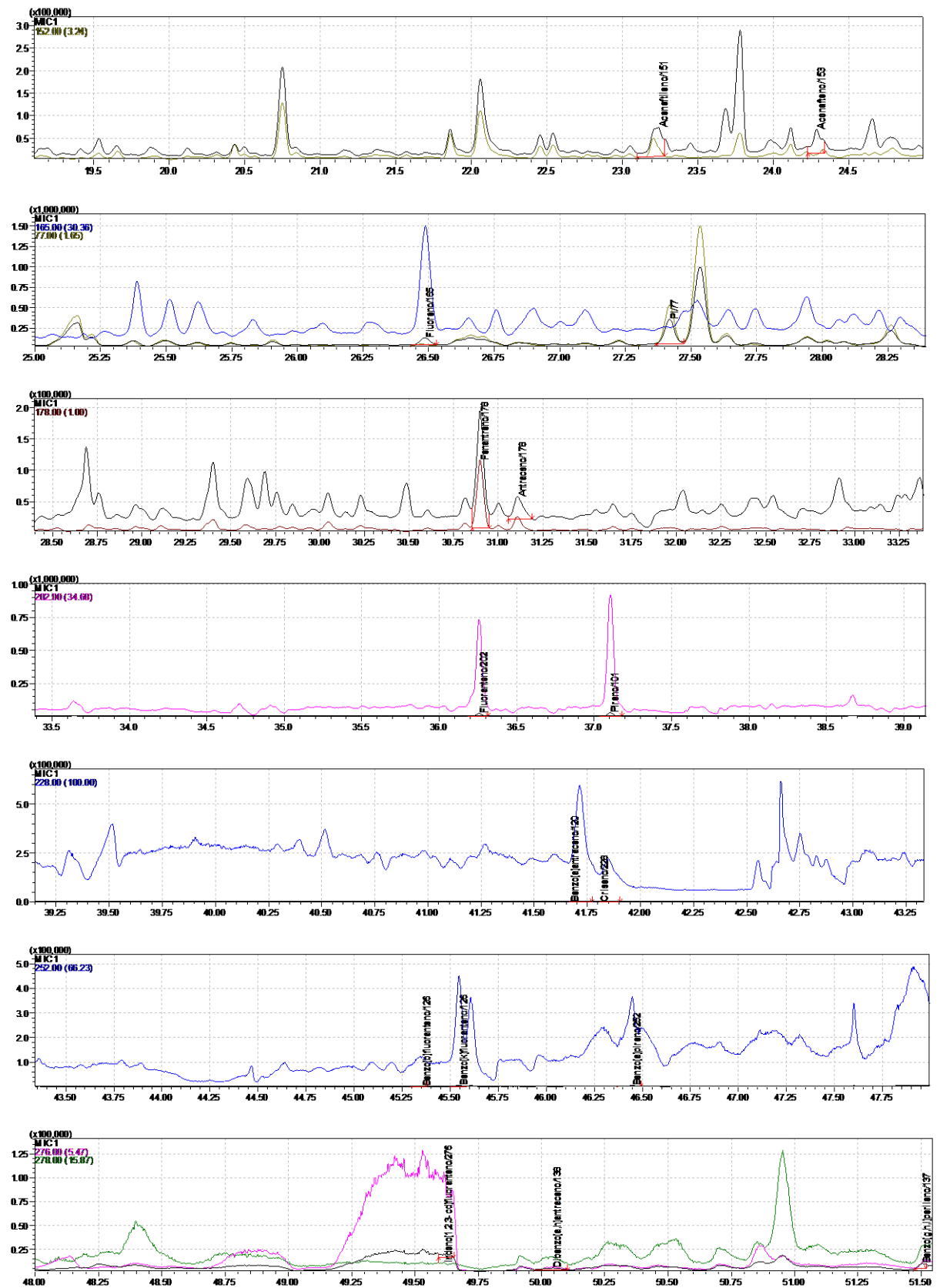
Conforme mostra a Figura 10, os HPAs naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo[a]antraceno e criseno não foram detectados na recuperação nos limites de detecção. Devido esses compostos terem as pressões de vapores mais altas, eles não foram detectados no processo de extração. Guerin (1999), utilizando Soxhlet, também observou tal comportamento na determinação de HPAs em matrizes sólidas.

A Figura 11 apresenta os cromatogramas da amostra de caju na concentração de $20 \mu\text{g/L}$, nos quais é possível observar os tempos e m/z de cada amostra.

Figura 11 - Cromatograma da amostra de caju – $20 \mu\text{g/L}$



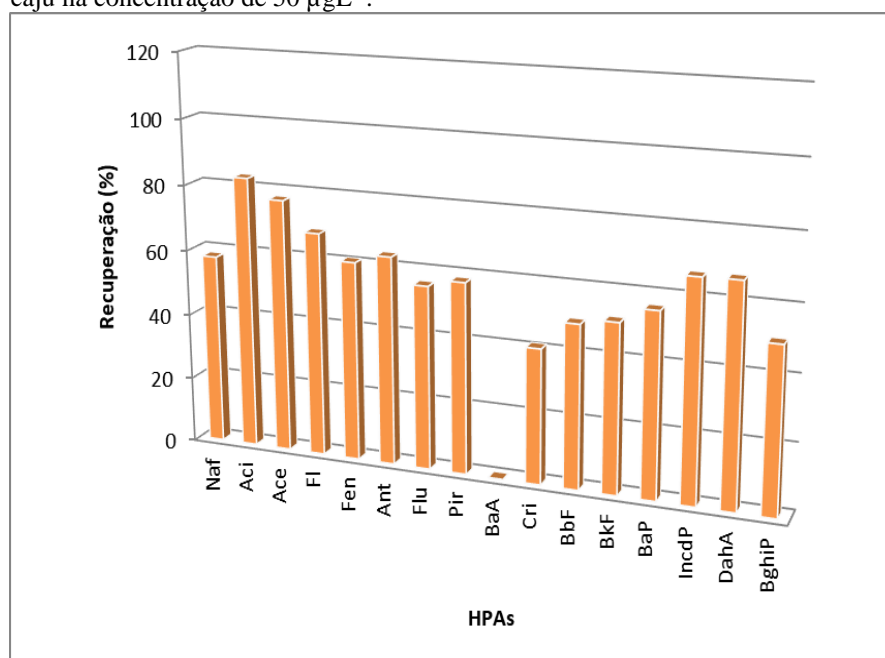
Continuação da Figura 11 - Cromatograma da amostra de caju – 20 µg/L



Fonte: Dados da pesquisa

A Figura 12 apresenta o percentual de recuperação de HPAs utilizando Soxhlet em amostras de caju na concentração de $50 \mu\text{gL}^{-1}$.

Figura 12 – Recuperações de HPAs utilizando soxhlet em amostras de caju na concentração de $50 \mu\text{gL}^{-1}$.

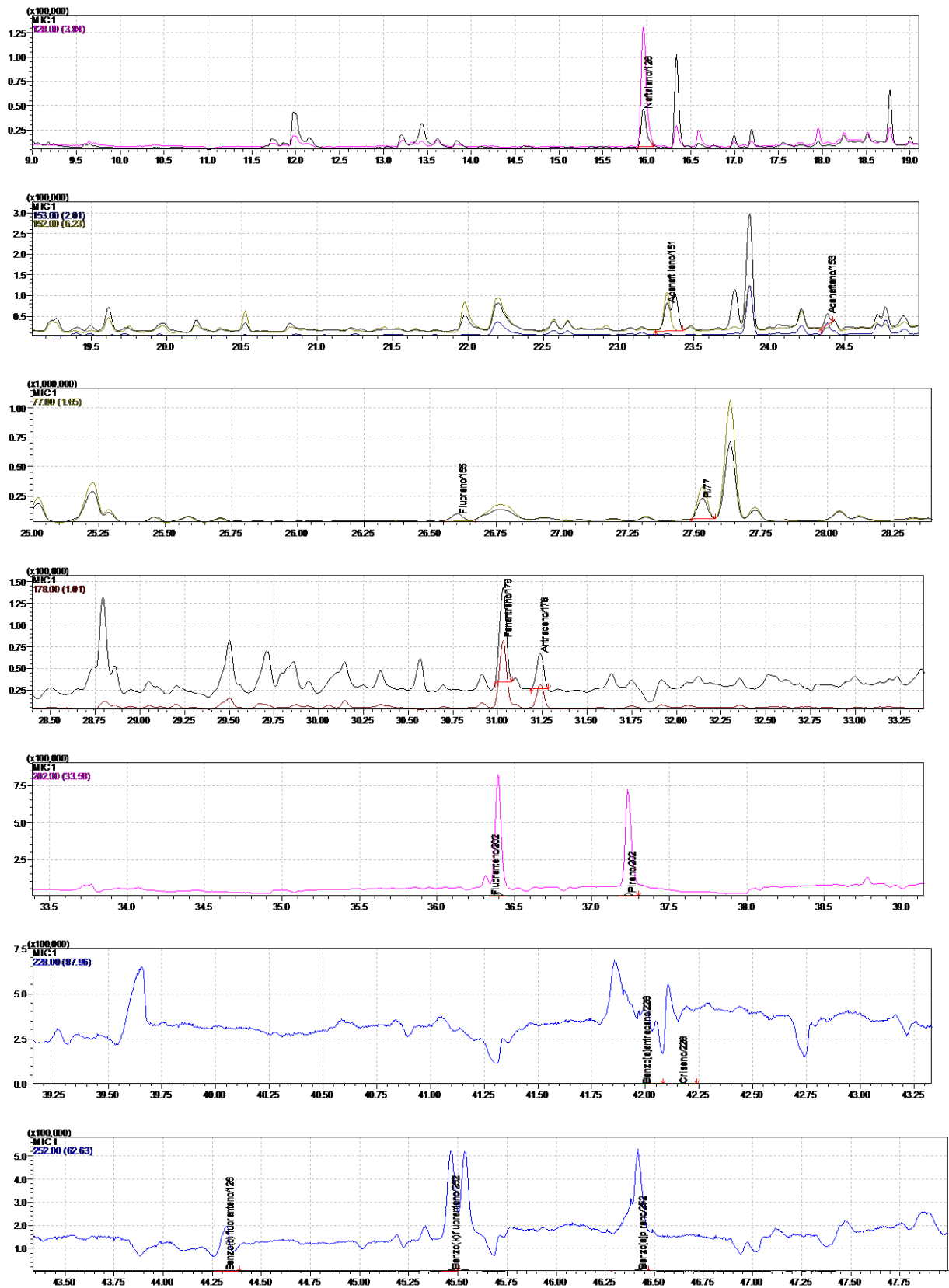


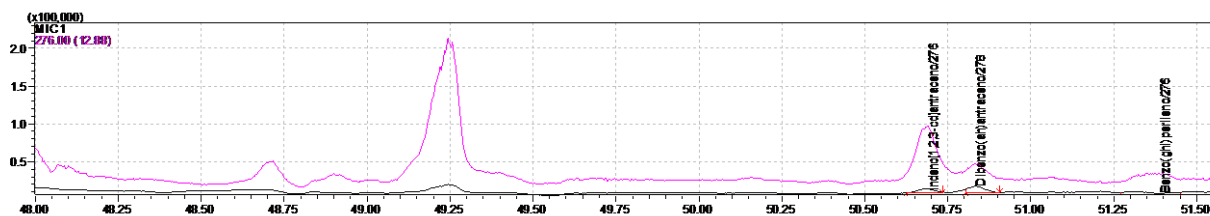
Fonte: Dados da pesquisa

Como mostra a Figura 12, na concentração de $50 \mu\text{gL}^{-1}$, o método Soxhlet apresentou uma satisfatória recuperação dos HPAs, obtendo-se uma extração com resultados significativos de 15 HPAs dos 16 HPAs estudados neste trabalho. A eficiência de recuperação variou de não detectado a 80 %. Essumang *et al.* (2013), estudando a recuperação de 16 HPAs em alimentos, também obtiveram uma recuperação com extração por Soxhlet, usando como solvente o diclorometano, os quais variaram de 60 a 100 %.

Os compostos de baixa massa molar apresentaram uma baixa eficiência, devido serem compostos voláteis. Portanto, com o aquecimento no sistema Soxhlet os mesmos sofreram perdas, não sendo possível assim serem detectados pelo CG-MS. Nessa concentração também não foi possível recuperar em nível de detecção o benzo[a]antraceno.

Na Figura 13 são apresentados os cromatogramas da amostra de caju na concentração de $50 \mu\text{gL}^{-1}$. Pode-se observar o tempo de amostras e m/z.

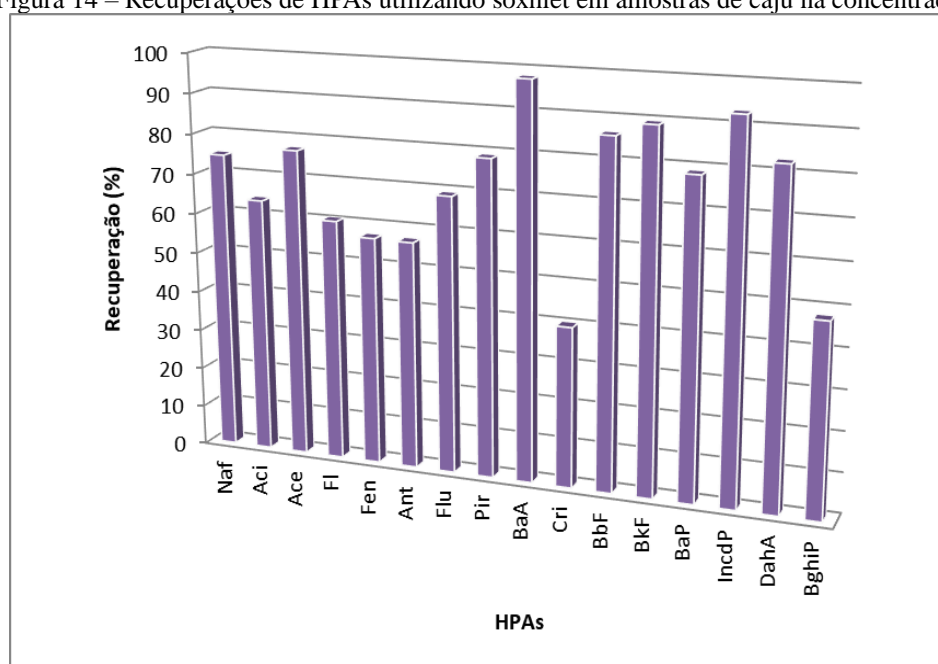
Figura 13 - Cromatograma da amostra de caju – 50 µgL⁻¹.



Fonte: Dados da pesquisa.

A Figura 14 apresenta o percentual de recuperação de HPAs utilizando Soxhlet em amostras de caju na concentração de $100 \mu\text{gL}^{-1}$.

Figura 14 – Recuperações de HPAs utilizando soxhlet em amostras de caju na concentração de $100 \mu\text{gL}^{-1}$.

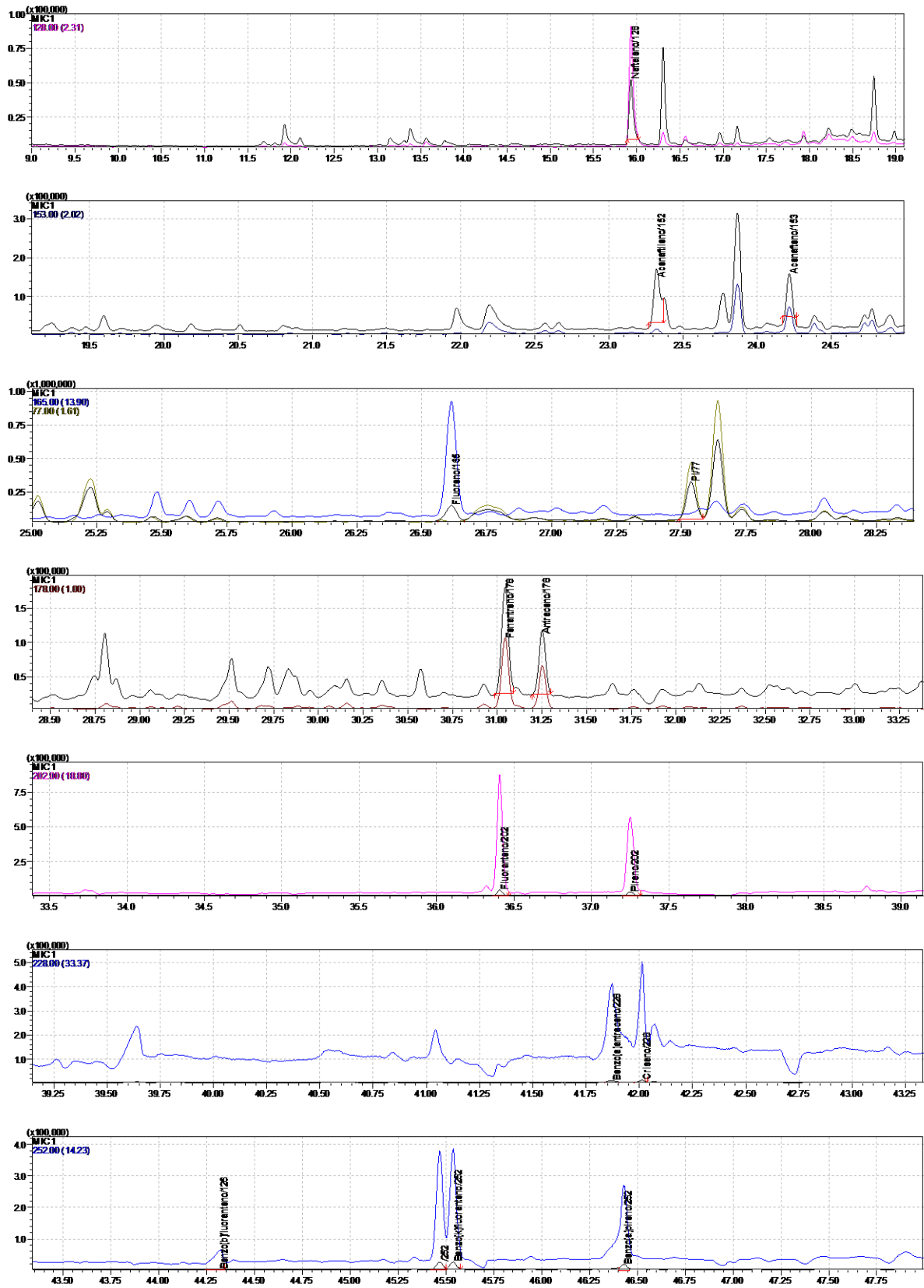


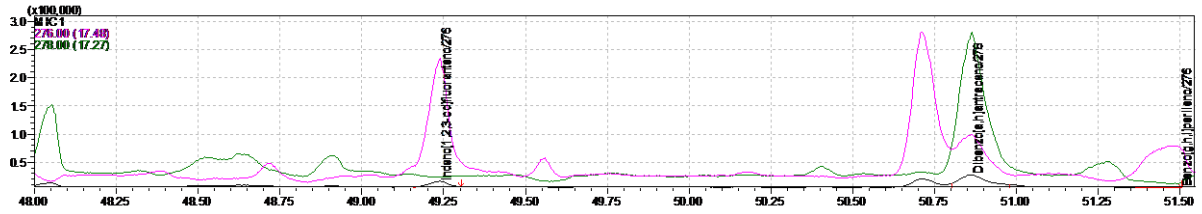
Fonte: Dados da pesquisa.

De acordo com a Figura 14, na concentração de $100 \mu\text{gL}^{-1}$, foi possível obter o nível de detecção a eficiência de extração dos 16 HPAs estudados. Sendo, portanto, considerada uma boa concentração para extrair HPAs em matriz orgânica. A eficiência de extração variou de 40 a 98 %. No trabalho de Essumang *et al.* (2012), também obtiveram uma recuperação de 56 a 108 %, utilizando o mesmo processo de extração desse trabalho. A extração foi realizada em produtos de pesca com o solvente de diclorometano.

Na Figura 15 são apresentados os cromatogramas da amostra de caju na concentração de $100 \mu\text{gL}^{-1}$. Pode-se observar o tempo de amostras e m/z.

Figura 15 – Cromatogramas da amostra de caju – 100 µg/L.





Fonte: Dados da pesquisa.

A Tabela 8 apresenta o resultado da análise da amostra de caju.

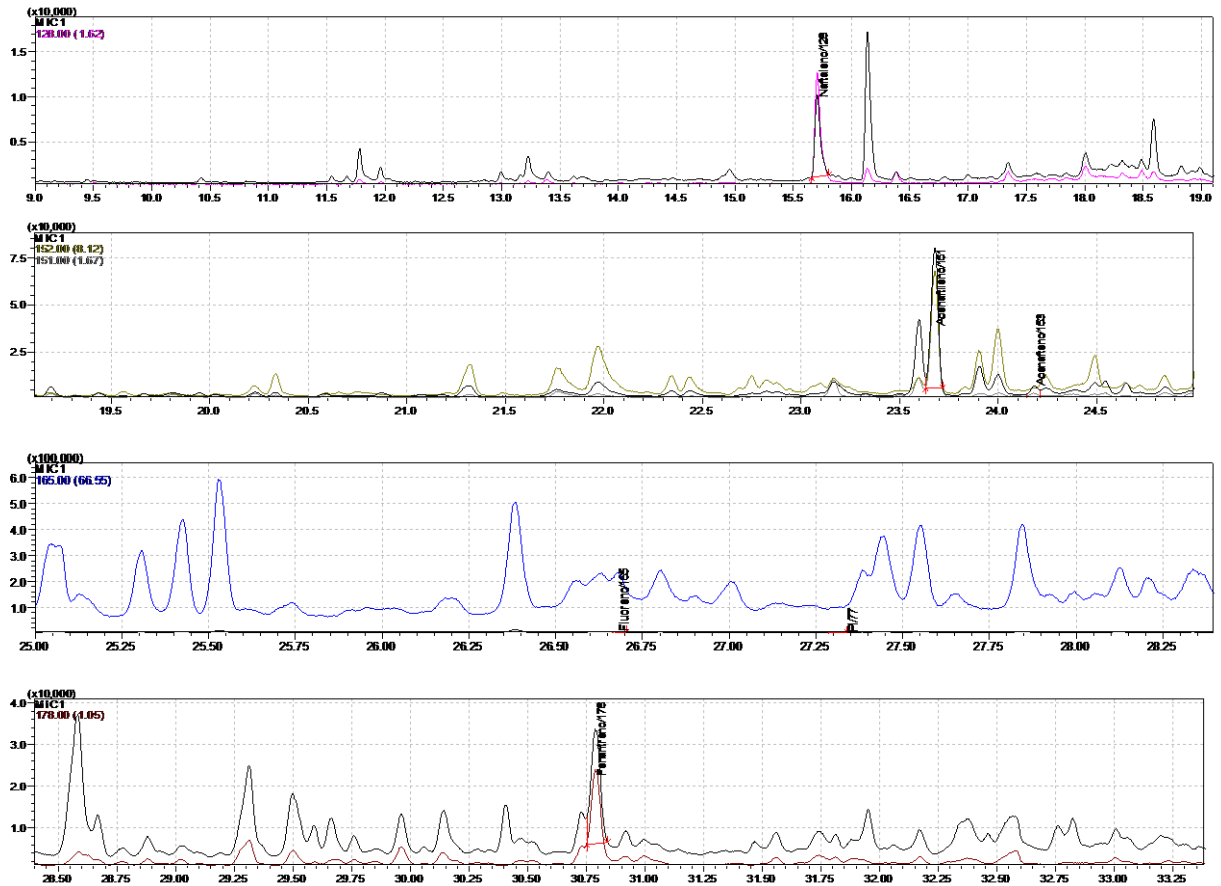
Tabela 8 - Análise da amostra de caju.

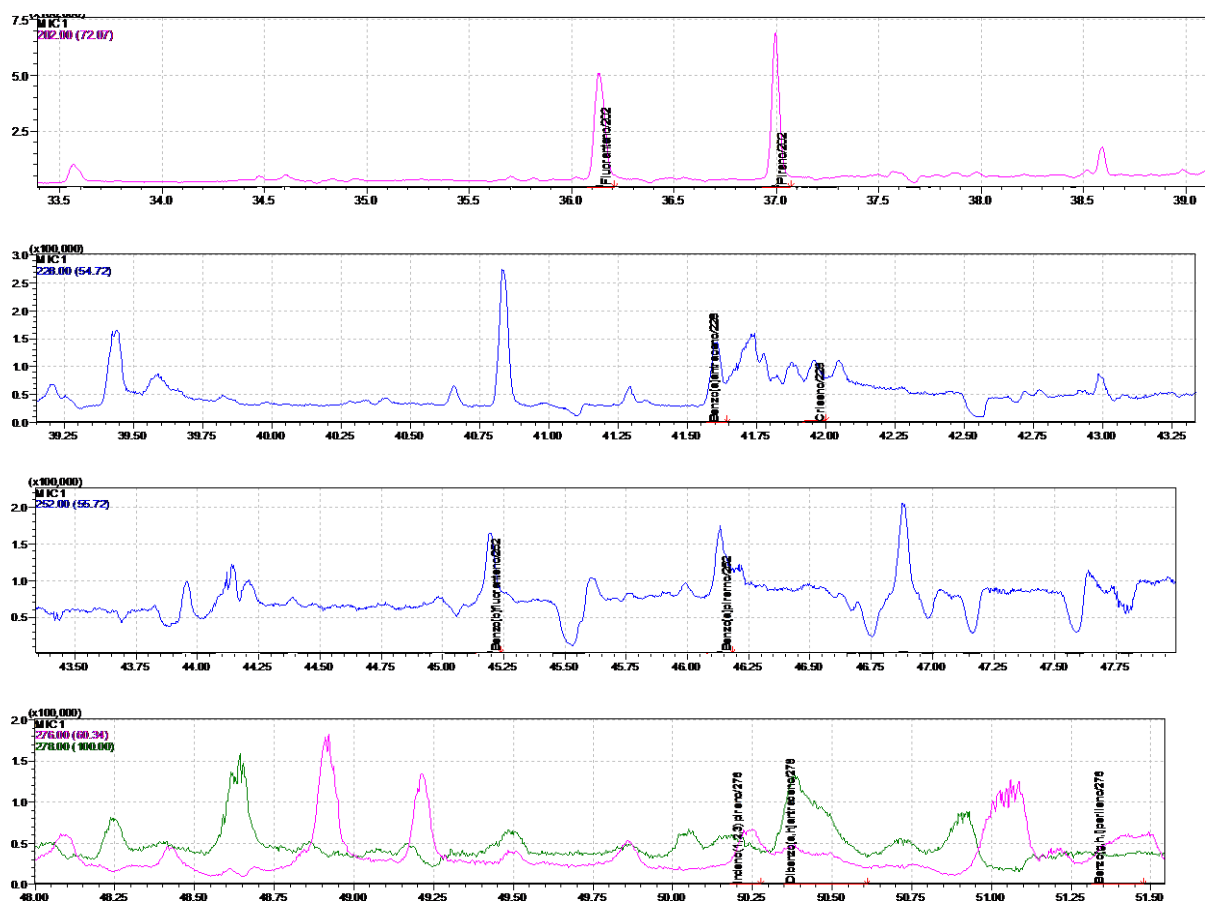
HPAs	[ng/g] ps de HPAs em caju
Cri	0,476
BbF	0,004
IncdP	0,006
DahA	0,007

Fonte: Dados da pesquisa *ps= peso seco

A Figura 16 mostra os cromatogramas da amostra de caju.

Figura 16 -Cromatogramas obtidos da amostra de caju





Fonte: Dados da pesquisa.

De acordo com os dados acima (Tabela 8 e Figura 14), verificou-se a presença de quatro HPAs nas amostras de caju, sendo eles: criseno, benzo[b]fluoranteno, indeno[1,2,3-cd]fluoranteno e o dibenzo[a,h]antraceno. A maioria dos HPAs apresentaram concentração abaixo do limite de detecção, tais como: naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo[a]antraceno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno e benzo[g,h,i]perileno.

Segundo Camargo e Toledo (2003), a ocorrência de HPAs em frutas e hortaliças se deve, principalmente, à poluição ambiental. Neste caso, o material particulado se deposita na superfície destes. O nível de contaminação depende da localização da plantação e da área de superfície do alimento exposta à contaminação. As plantações situadas próximas a rodovias dão origem a produtos com maiores teores de HPAs, devido a uma maior exposição aos poluentes.

No trabalho de Kumari *et al.* (2012), foram detectados os 16 HPAs em doces de chocolate com limite de detecção variando de 0,4 a 4 ng/g. O método de extração utilizado pelos autores foi por saponificação, sendo, portanto, um motivo que fez com que todos os

compostos fossem detectados, ou seja, o método de extração não causou perda de nenhum composto.

Já o método de extração utilizado nesse trabalho tem como procedimento Soxhlet, podendo ocasionar, devido ao aquecimento, a não detecção de alguns compostos pelo CG-MS.

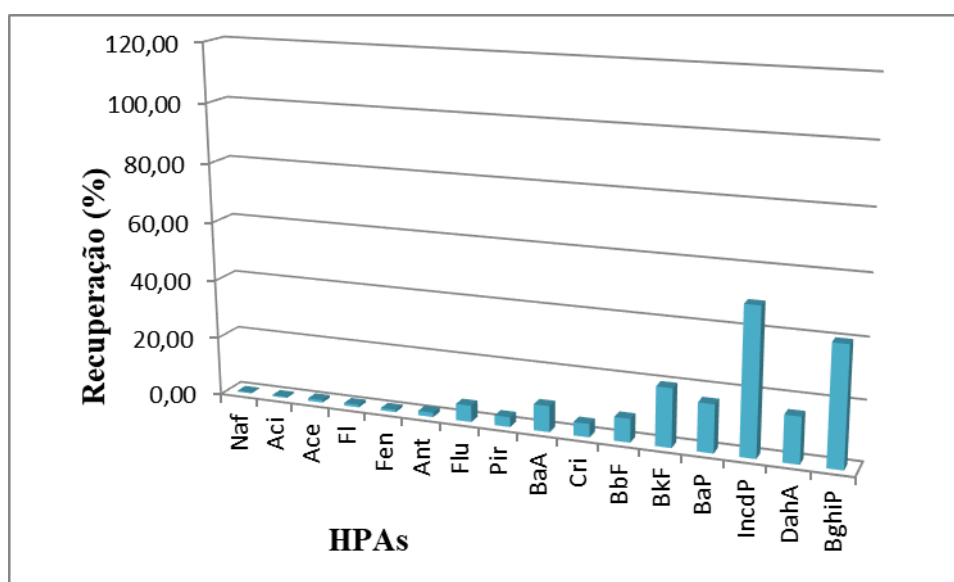
Comparando o LD das amostras de caju com o LD amostras de doce de chocolate do trabalho de Kumari *et al.* (2012), pode-se observar que o LD das amostras do caju estão abaixo. Porém, comparando com o trabalho de Kazerouni *et al.*, (2001), o limite de detecção encontrado em vários tipos frutas foram de 0,19 ng/g para o tomate, 0,16 ng/g para a banana, 0,10 ng/g para a maçã e 0,16 ng/g para a laranja.

Qui *et al.* (2011) mostraram o limite de detecção em vários alimentos, e dentre eles pode-se destacar o caju, no qual foi o encontrando uma faixa de n.d a 8,73 ng/g. Nesse trabalho foi utilizada a técnica de extração por Soxhlet e analisada por CG-MS.

4.6 Extrações de HPAs provenientes de amostra de tomate pelo método Soxhlet

Os extratos de tomates dopados na concentração de $20 \mu\text{gL}^{-1}$, apresentaram uma recuperação de ND (não detectado) a 49 %, como pode observado na Figura 17.

Figura 17 – Recuperações de HPAs utilizando soxhlet em amostras de tomate na concentração de $20 \mu\text{gL}^{-1}$



Fonte: Dados da pesquisa.

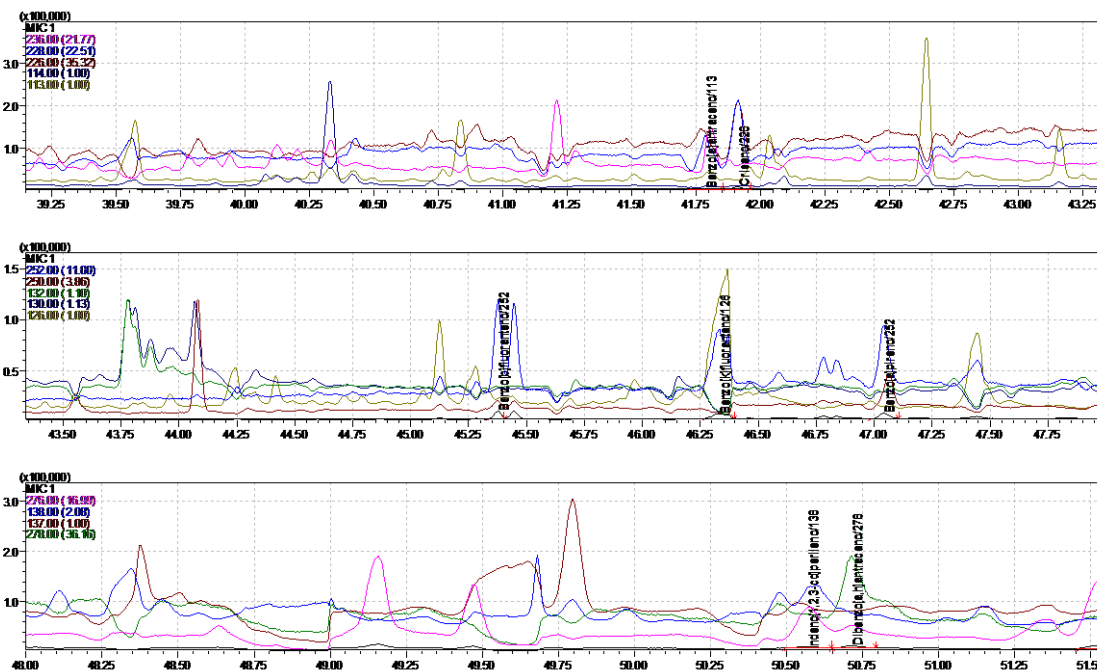
Como mostra a Figura 17, os compostos de baixa massa molecular (naftaleno,

acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, benzo[a]antraceno e criseno apresentaram uma baixa recuperação, muito provavelmente devido ao método de extração, pois os compostos de baixa massa molar podem se perder na extração por Soxhlet, pois são compostos voláteis. Segundo Calvante (2007), a volatilidade dos HPAs aumenta com diminuição da massa molar, dessa forma apresentam alta pressão vapor.

Na literatura foram encontrados os seguintes trabalhos: Liang *et al.* (2007) utilizaram Soxhelt para extrair matrizes alimentares, utilizando uma mistura de solvente (acetona e diclorometano) e tendo como resultando uma recuperação de não detectado a 66,8 %. Já no trabalho de Vives *et al.* (2004) obtiveram uma recuperação na faixa de 10 a 50 %, tendo como matiz amostras de peixes e utilizaram como solventes hexano e diclorometano. Na Figura 18 pode-se confirmar o resultado do Figura 17.

Figura 18- Cromatograma da amostra -20 µg/L

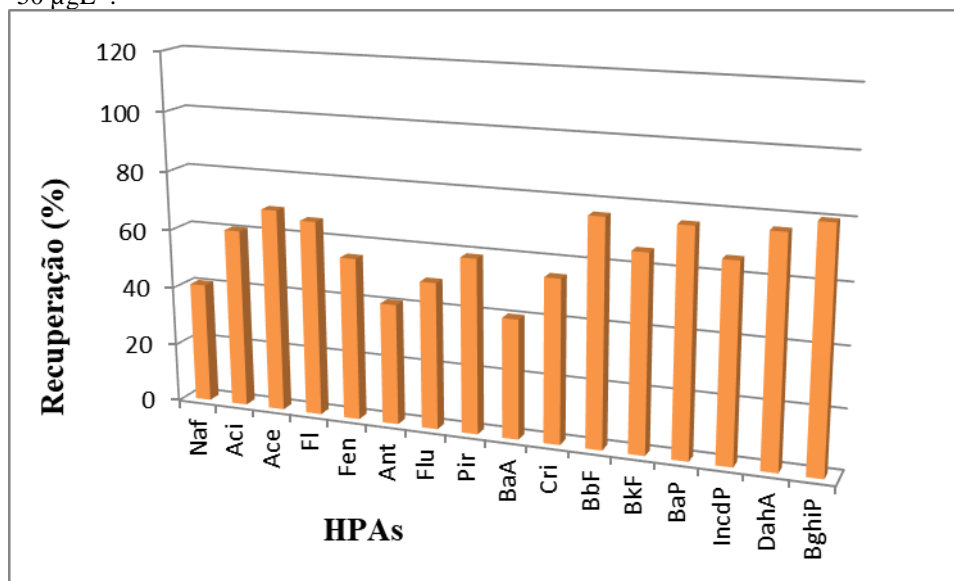




Fonte: Dados da pesquisa.

Dados de percentual de recuperação de HPAs, utilizando o método Soxhlet, em amostras de tomate na concentração de $50 \mu\text{gL}^{-1}$ são apresentados na Figura 19.

Figura 19– Recuperações de HPAs utilizando soxhlet em amostras de tomate na concentração de $50 \mu\text{gL}^{-1}$.

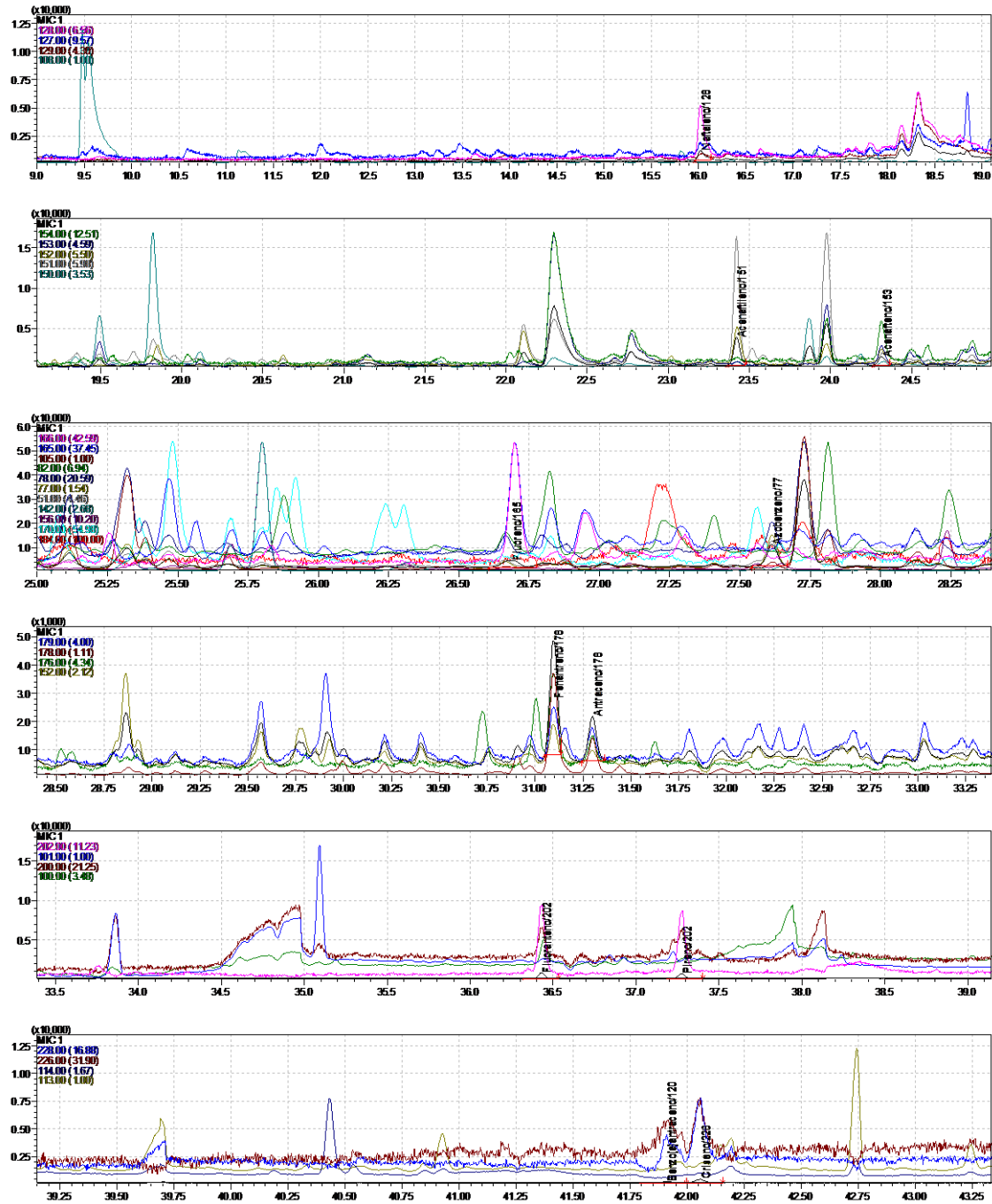


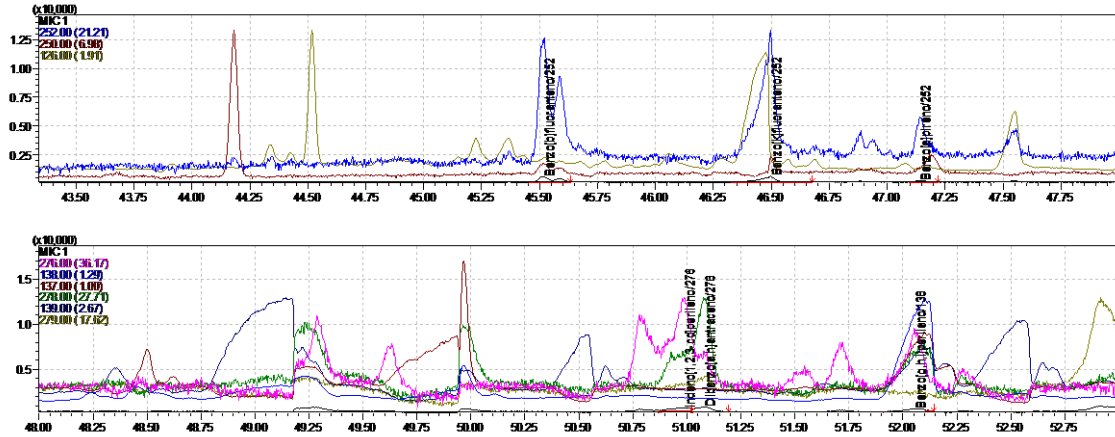
Fonte: Dados da pesquisa.

Como mostra a Figura 19, a amostra de tomate na concentração $50 \mu\text{gL}^{-1}$ apresentou uma recuperação mais satisfatória do que a recuperação das amostras de tomate na concentração de $20 \mu\text{gL}^{-1}$. A recuperação obtida foi de 40 a 80 %.

A Figura 20 apresenta os cromatogramas da amostra de tomate referentes à concentração de 50 µg/L.

Figura 20 - Cromatograma da amostra 50 µg/L.

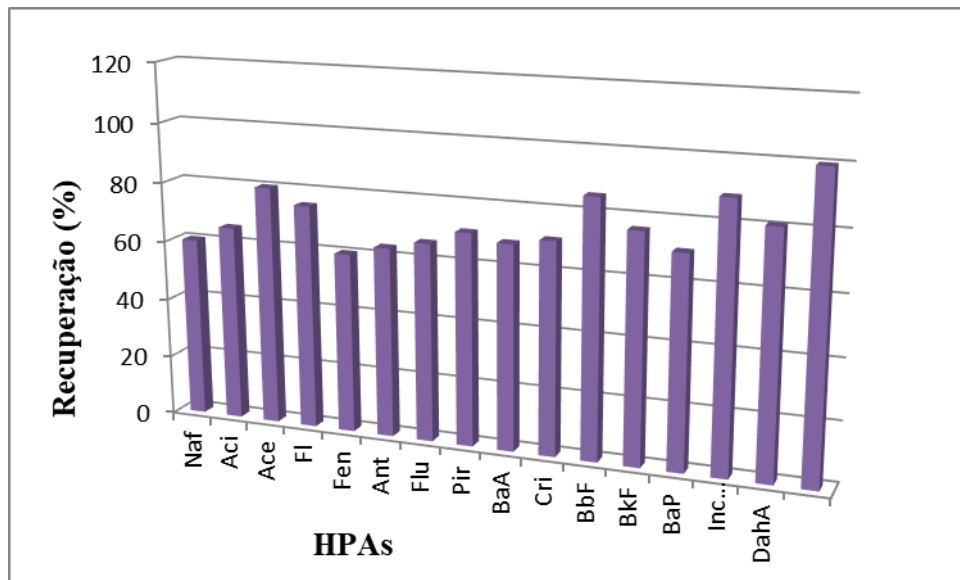




Fonte: Dados da pesquisa.

Dados de percentual de recuperação de HPAs, utilizando o método Soxhlet, em amostras de tomate na concentração de $100 \mu\text{gL}^{-1}$ são apresentados na Figura 21.

Figura 21 – Recuperações de HPAs utilizando soxhlet em amostras de tomate na concentração de $100 \mu\text{gL}^{-1}$.



Fonte: Dados da pesquisa.

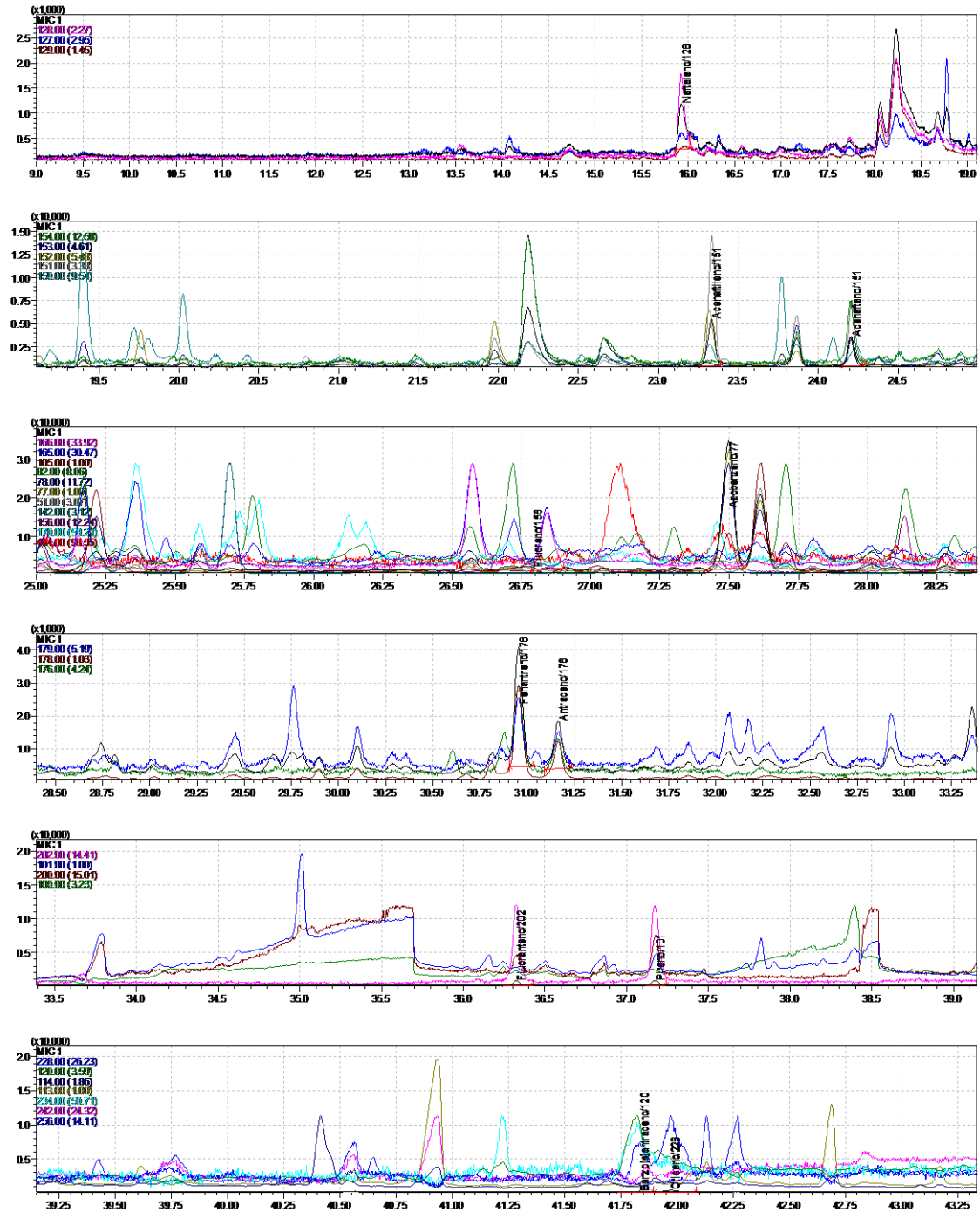
Os resultados mostrados na Figura 21 indicam uma extração por Soxhelt satisfatória, pois os compostos dopados como HPAs na concentração $100 \mu\text{gL}^{-1}$ apresentaram uma recuperação de 60 a 100 %.

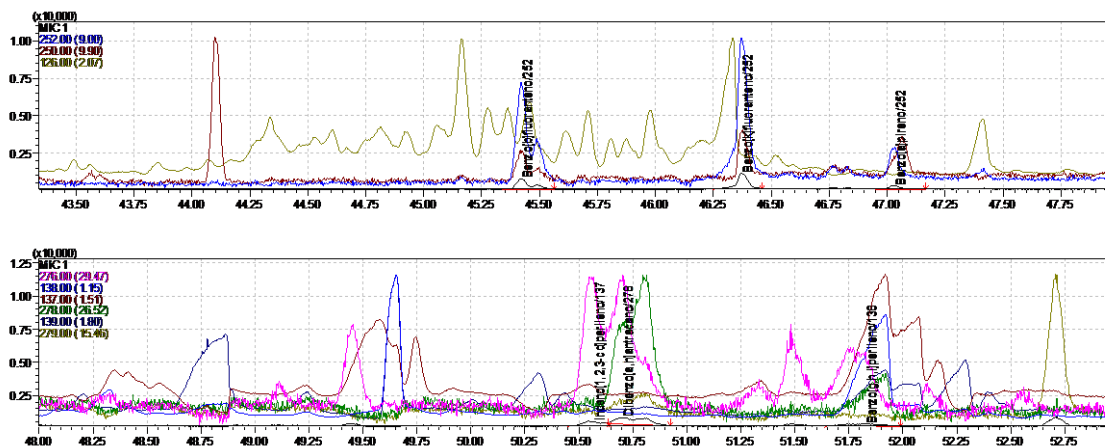
Khan *et al.* (2008) apresentaram uma recuperação de HPAs em amostras de alface na faixa de 92 a 106 %. Foi encontrada, também, na literatura uma recuperação de 71 a 130 % no trabalho de Vives e Grimalt (2002). Essa extração foi realizada com diclorometano e

hexano em amostras de peixe.

A Figura 22 apresenta os cromatogramas da amostra de tomate na concentração de $100 \mu\text{gL}^{-1}$.

Figura 22 - Cromatograma da amostra $100 \mu\text{gL}^{-1}$.





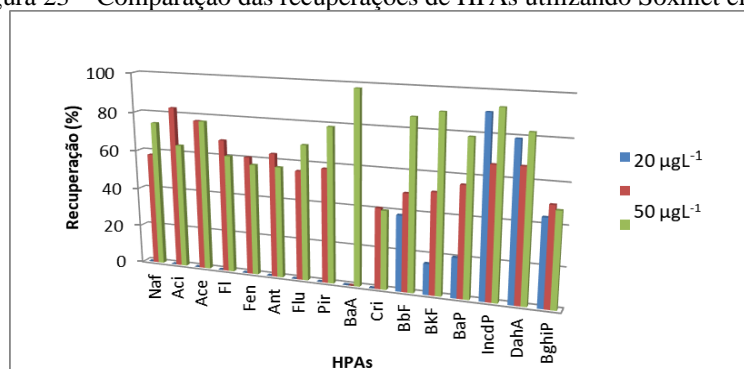
Fonte: Dados da pesquisa.

4.7 Comparação das recuperações das amostras de tomate e caju por Soxhlet.

As Figuras 23 e 24 mostram as comparações dos resultados obtidos da eficiência de recuperação de HPAs em amostras de caju e tomate, respectivamente. Pode-se observar que a recuperação se torna mais eficiente com o aumento da concentração. Segundo Sun *et al.* (2006), quando as concentrações de HPAs são reduzidas as recuperações diminuem.

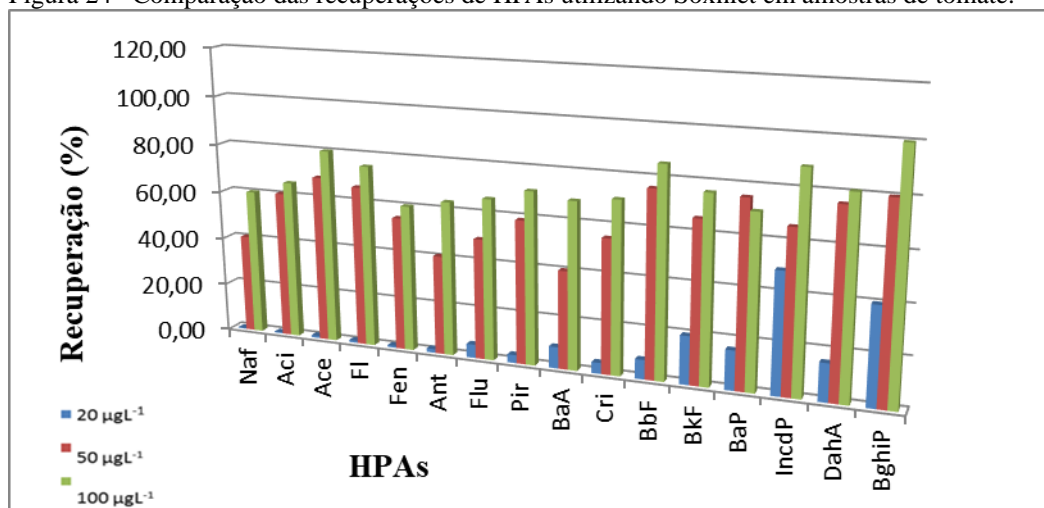
De acordo com Ganzler, Szinai e Salgó (1990) e Phillips (1999), a técnica de extração sólido-líquido mais amplamente usada é a extração com auxílio de Soxhlet. Os autores explicam que esta técnica pode ser empregada na análise de frutas e legumes, contudo requer um tempo de extração de 6 a 48 horas, consumindo grande volume de solventes orgânicos e sendo extremamente laboriosa. Mas, por causa da complexidade das matrizes alimentares, a presença de substâncias que interferem com o processo de extração ou com a separação e identificação dos HPAs, podem necessitar de limpeza adicional de extratos antes da análise.

Figura 23 – Comparação das recuperações de HPAs utilizando Soxhlet em amostras de caju.



Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 24– Comparação das recuperações de HPAs utilizando Soxhlet em amostras de tomate.



Fonte: Dados da pesquisa.

A Tabela 9 apresenta o resultado da análise da amostra de tomate.

Tabela 9 – Análise da amostra de tomate.

HPAs	[ng/g] ps de HPAs em tomate
Naf	0,030
Ant	0,010
Flu	0,005
Pir	0,007
BbF	0,004
BkF	0,003
BaP	0,003

Fonte: Dados da pesquisa.

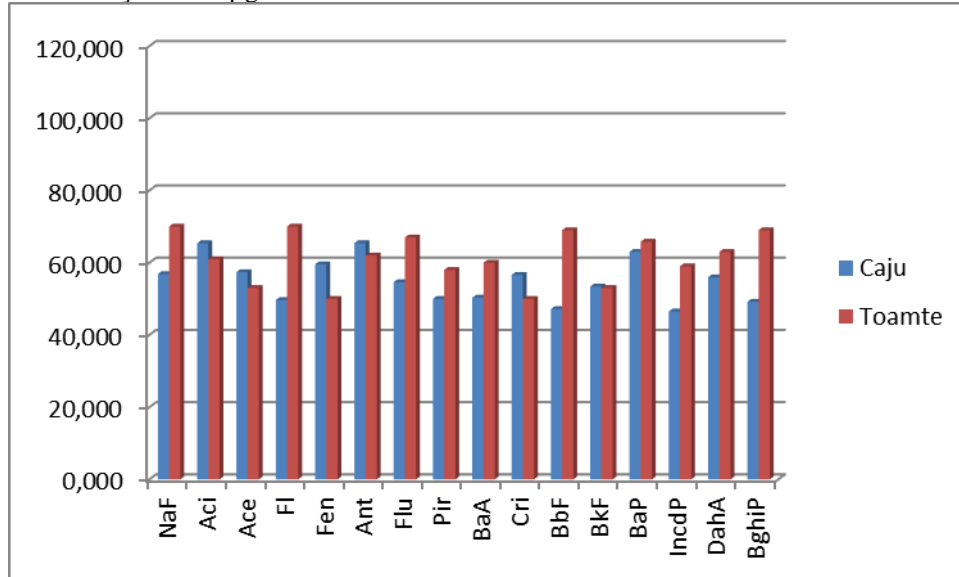
Como mostra a Tabela 9, verificou-se a presença de sete HPAs nas amostras, sendo eles: naftaleno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno. Os HPAs que ficaram abaixo do limite de detecção foram: acenaftileno, acenafteno, fenantreno, benzo[a]antraceno, benzo[g,h,i]perileno, criseno, indeno[1,2,3-cd]fluoranteno e o dibenzo[a,h]antraceno.

4.8 Extrações de HPAs provenientes de amostra de caju e tomate pelo método DMFS

4.8.1 Extrações de HPAs provenientes de amostra de caju e tomate na concentração 20 µgL⁻¹

A Figura 25 apresenta os resultados obtidos das análises de extração de HPAs em amostras de tomate e caju, na concentração $20 \mu\text{gL}^{-1}$, utilizando o método DMFS.

Figura 25 – Recuperação dos HPAs utilizando DMFS em amostras de caju e tomate na concentração de $20 \mu\text{gL}^{-1}$

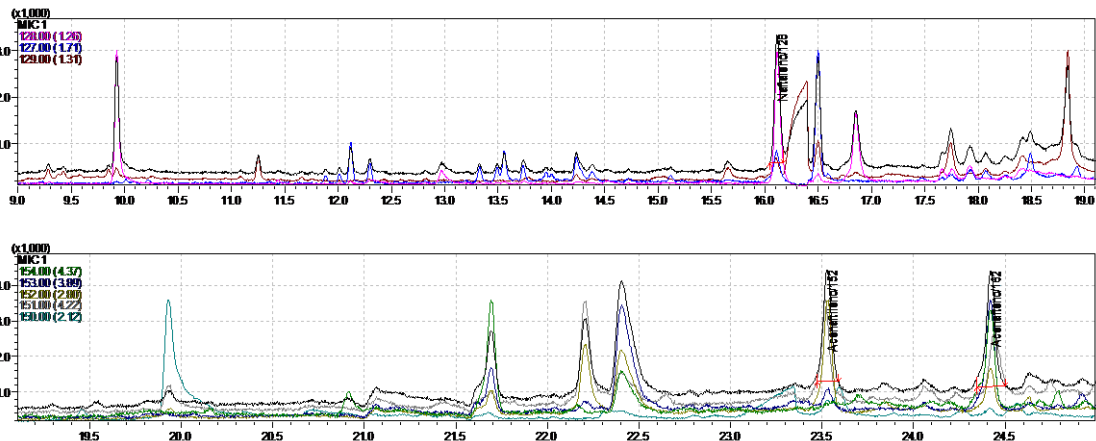


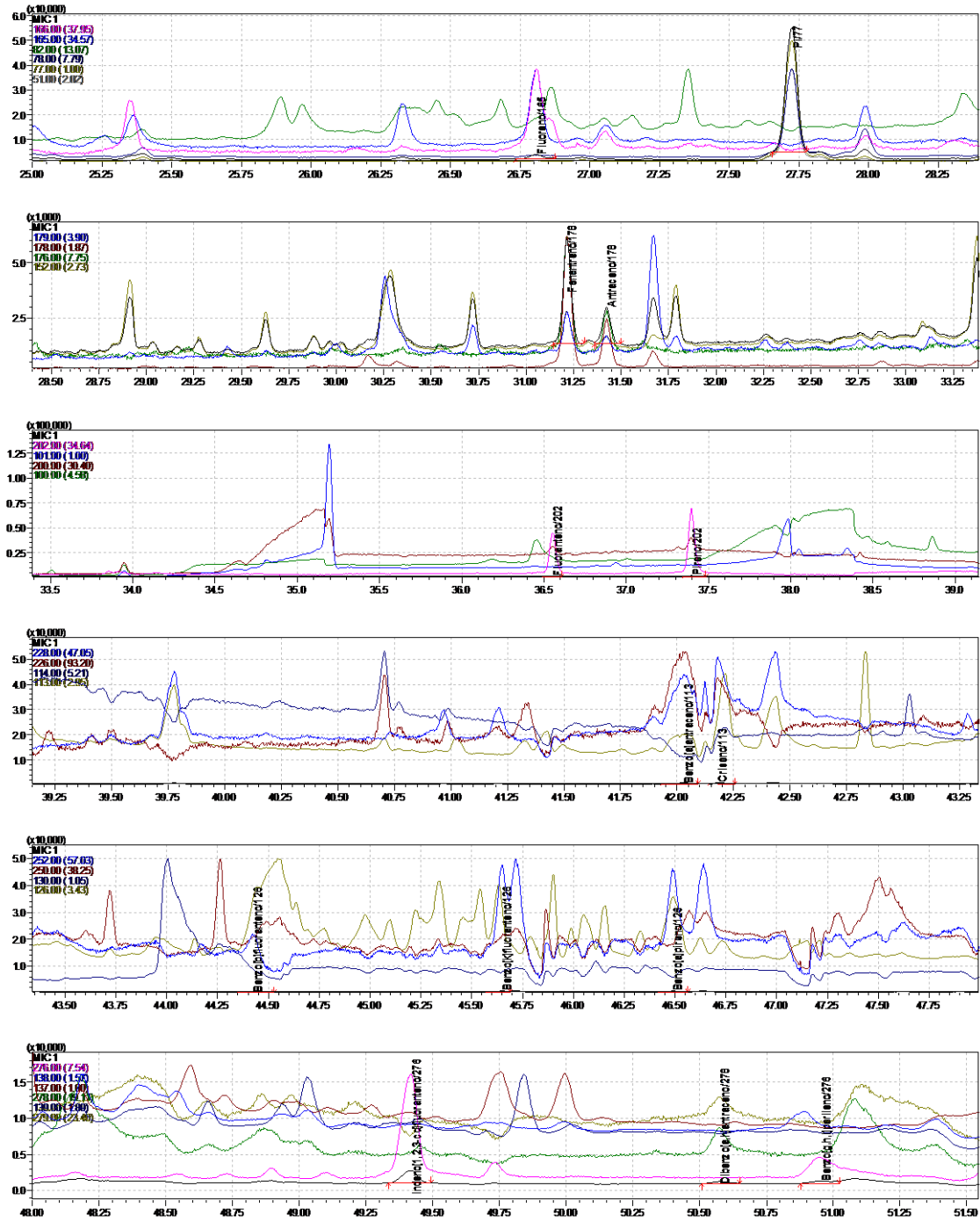
Fonte: Dados da pesquisa.

Observa-se que na concentração de $20 \mu\text{gL}^{-1}$ é possível recuperar os 16 HPAs analisados nas amostras de caju e tomate por DMFS. O percentual de recuperação obtido foi de 49,66 a 65 % para a amostra de caju e 50 a 70 % para o tomate. Pinho *et al.* (2009) apresentaram uma recuperação 50 a 90 %, também utilizando como técnica de extração DMFS em amostras de tomate.

As Figuras 26 e 27 apresentam os cromatogramas obtidos das amostras de caju e tomate na concentração de $20 \mu\text{gL}^{-1}$, respectivamente.

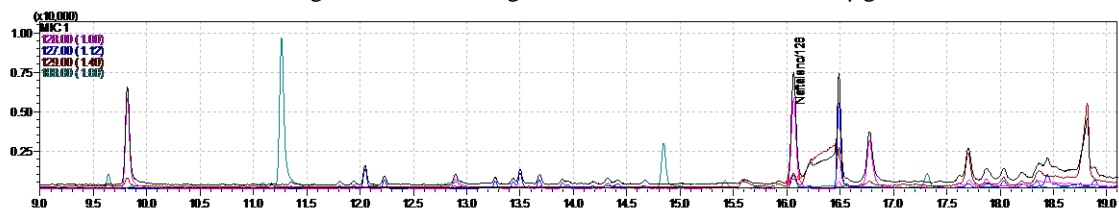
Figura 26 - Cromatograma da amostra de caju $20 \mu\text{gL}^{-1}$.

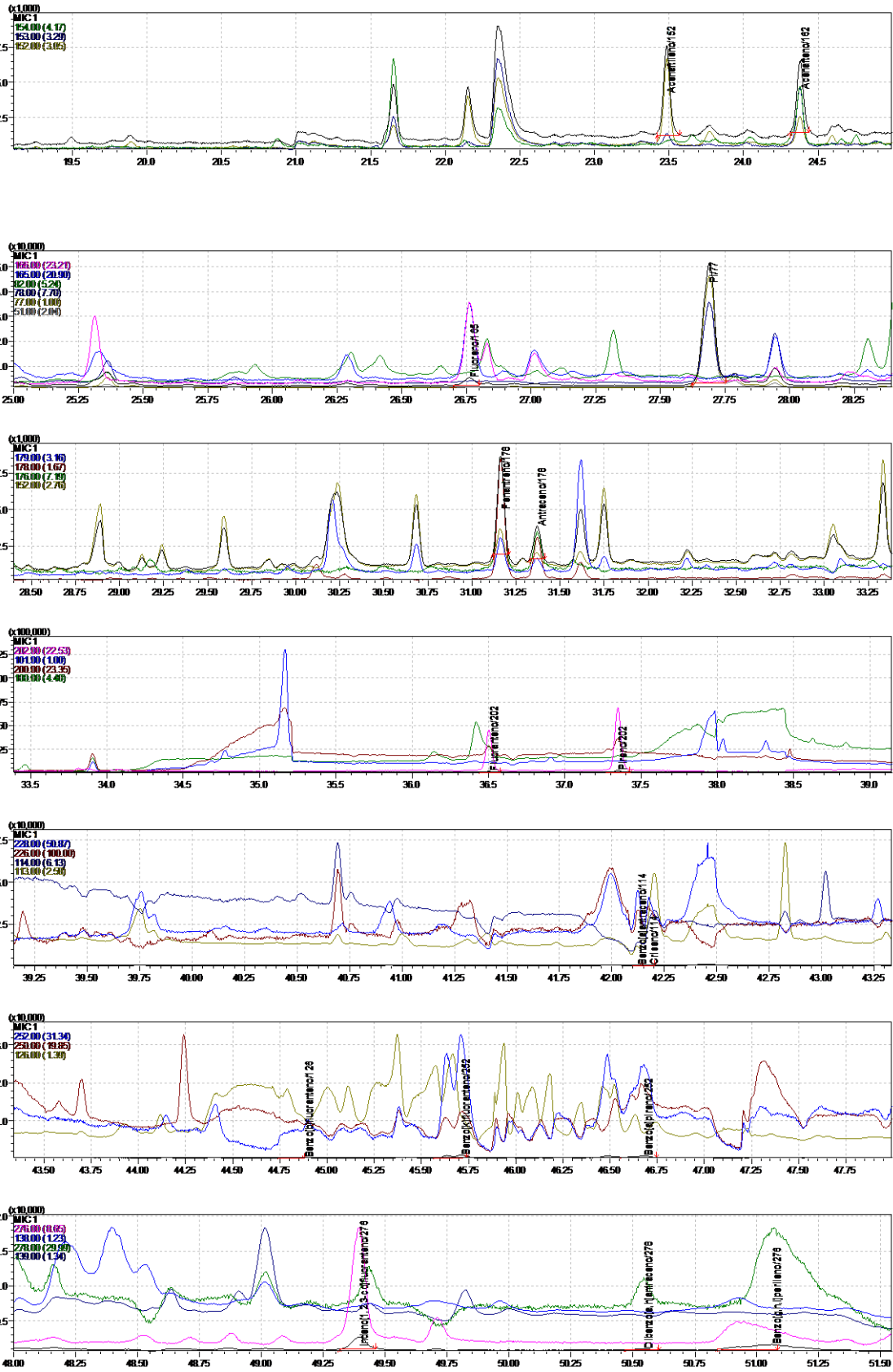




Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 27 - Cromatograma da amostra de tomate 20 µgL⁻¹.



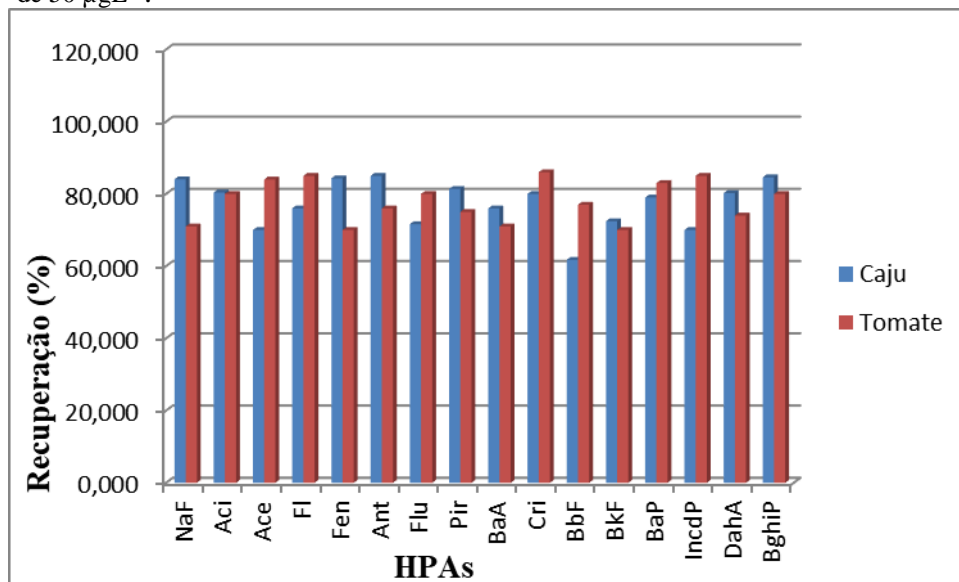


Fonte: Dados da pesquisa.

4.8.2 Extrações de HPAs provenientes de amostra de caju e tomate na concentração $50 \mu\text{gL}^{-1}$

A Figura 28 apresenta os resultados obtidos das análises de extração de HPAs em amostras de tomate e caju, na concentração $50 \mu\text{gL}^{-1}$, utilizando o método DMFS.

Figura 28 – Recuperação dos HPAs utilizando DMFS em amostras de caju e tomate na concentração de $50 \mu\text{gL}^{-1}$.

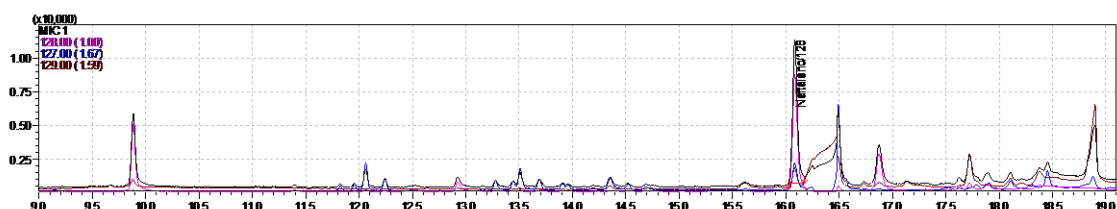


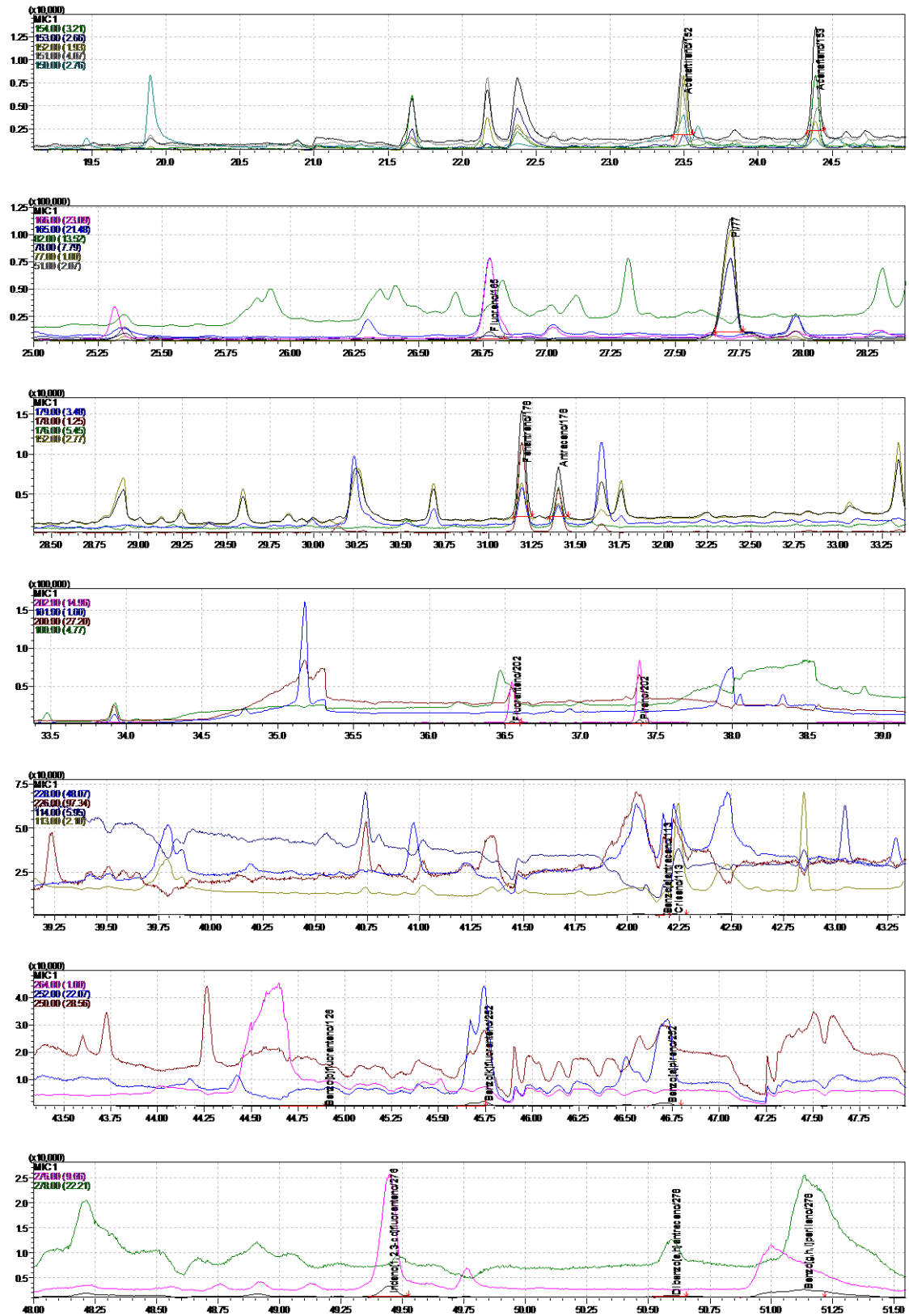
Fonte: Dados das pesquisa.

De acordo com a Figura 28, observa-se que foi possível recuperar os 16 HPAs analisados na concentração de $50 \mu\text{gL}^{-1}$, sendo obtida uma recuperação maior do que na concentração de $20 \mu\text{gL}^{-1}$. Os resultados obtidos foram: 61 a 85 % para o caju e 70 a 86 % para o tomate. Comportamento semelhante pode ser observado no trabalho Alberio, Sanchez-Brunet e Tadeo (2003), que obtiveram uma recuperação de 79,3 a 97,9 % , utilizando como técnica extratora DMFS.

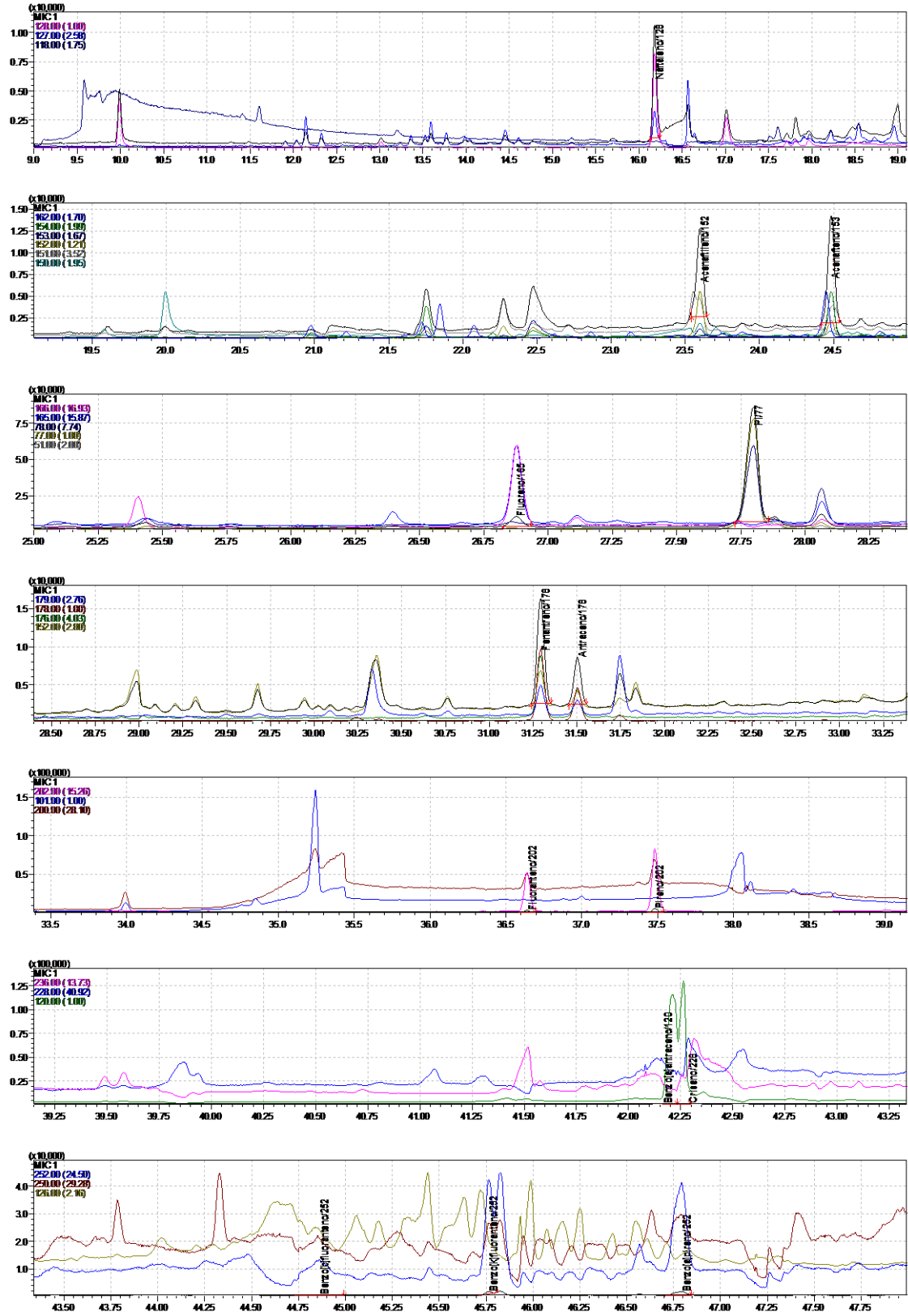
As Figuras 29 e 30 apresentam os cromatogramas das amostras de caju e tomate na concentração de $50 \mu\text{gL}^{-1}$.

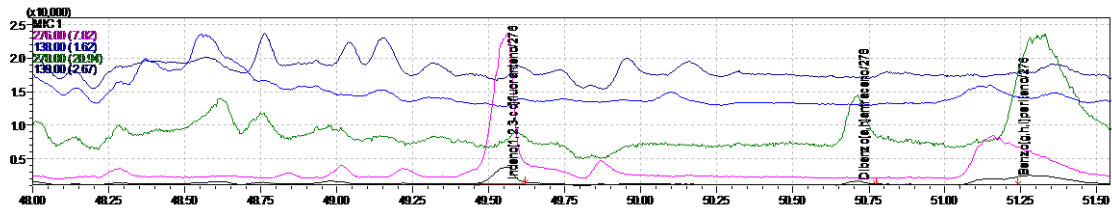
Figura 29 - Cromatograma da amostra de caju $50 \mu\text{gL}^{-1}$.





Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 30 - Cromatograma da amostra de tomate 50 µgL⁻¹.

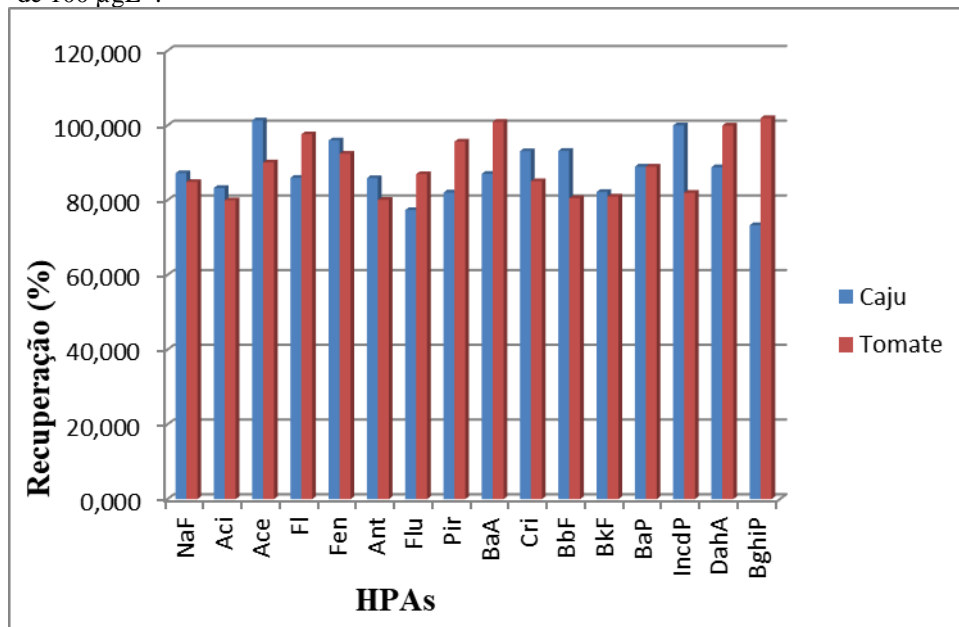


Fonte: Dados da pesquisa.

4.8.3 Extrações de HPAs provenientes de amostra de caju e tomate na concentração $100 \mu\text{gL}^{-1}$

A Figura 31 apresenta os resultados obtidos das análises de extração de HPAs em amostras de tomate e caju, na concentração $100 \mu\text{gL}^{-1}$, utilizando o método DMFS.

Figura 31 – Recuperação dos HPAs utilizando DMFS em amostras de caju e tomate na concentração de $100 \mu\text{gL}^{-1}$.

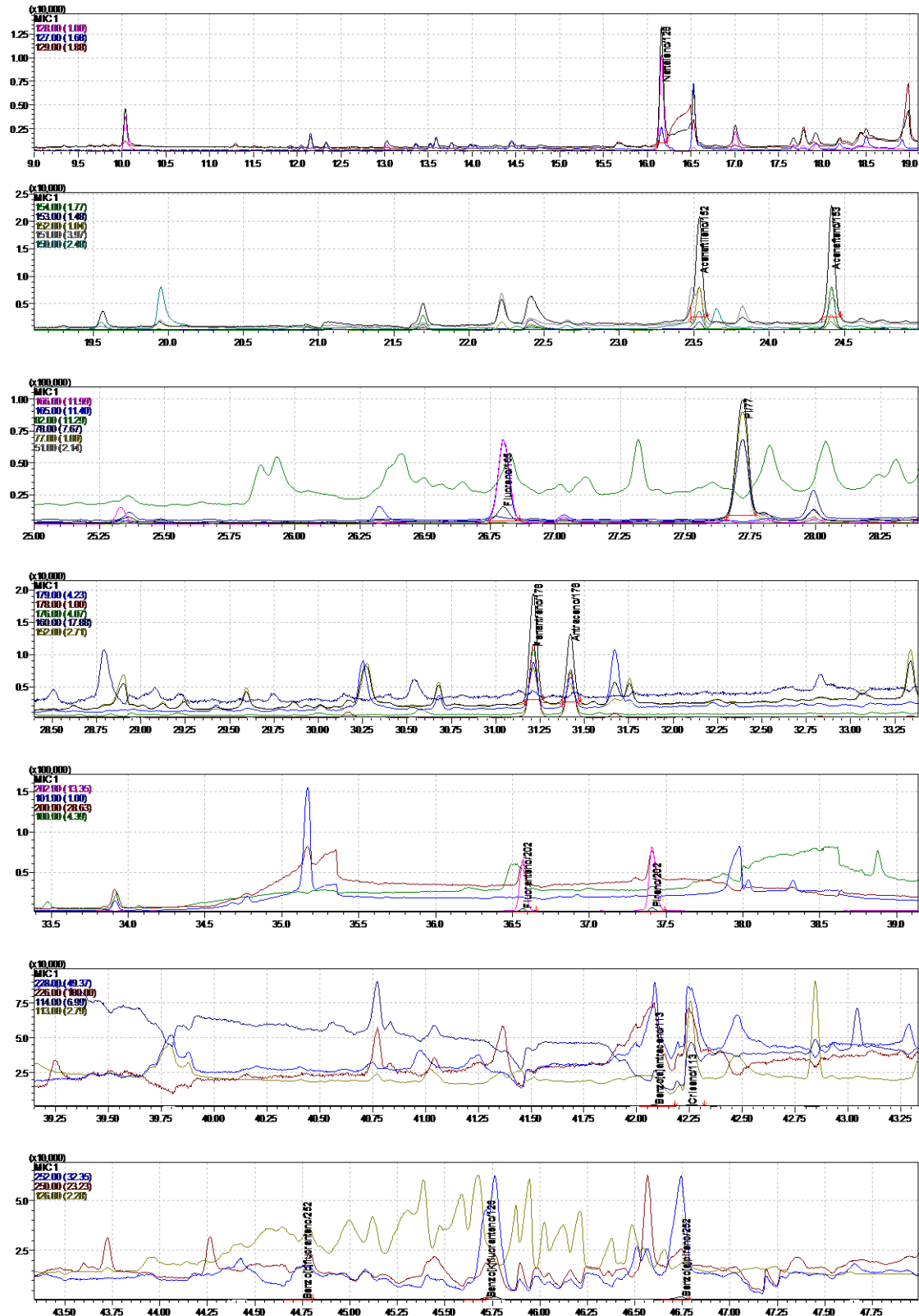


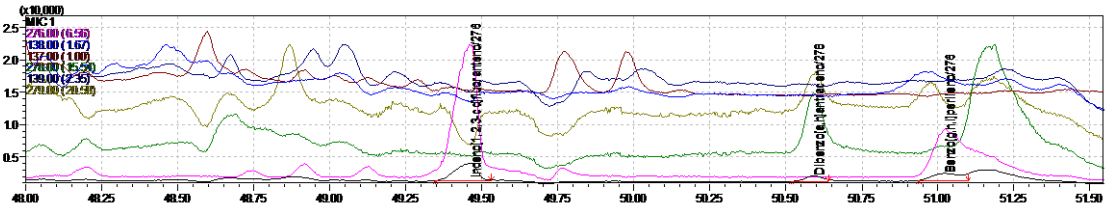
Fonte: Dados da pesquisa.

Como mostra a Figura 31, a recuperação dos HPAs na concentração $100 \mu\text{gL}^{-1}$ variou de 73,3 a 101 % para as amostras de caju e 80 a 102 % para as de tomate. De acordo com dados na literatura, esse resultado é considerado uma boa recuperação de HPAs por DMFS. Loveland *et al.* (2001) obtiveram uma recuperação de até 107% em alimentos, utilizando como técnica extratora DMFS. Resultado semelhante foi encontrado no trabalho de Navaro *et al.* (2002), no qual os autores apresentam um percentual de recuperação de HPAs de 62 a 102 %, por DMFS em frutas (tomate, maçã e laranja).

As Figuras 32 e 33 apresentam os cromatogramas obtidos das amostras de caju e tomate na concentração de $100 \mu\text{gL}^{-1}$, respectivamente.

Figura 32 - Cromatograma da amostra de caju na concentração de $100 \mu\text{gL}^{-1}$.

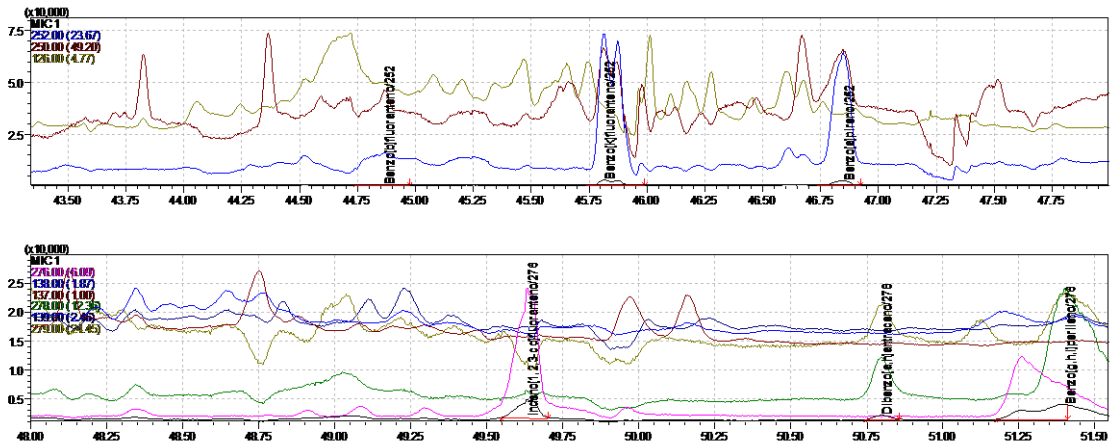




Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 33 - Cromatograma da amostra de tomate na concentração de 100 µgL⁻¹.



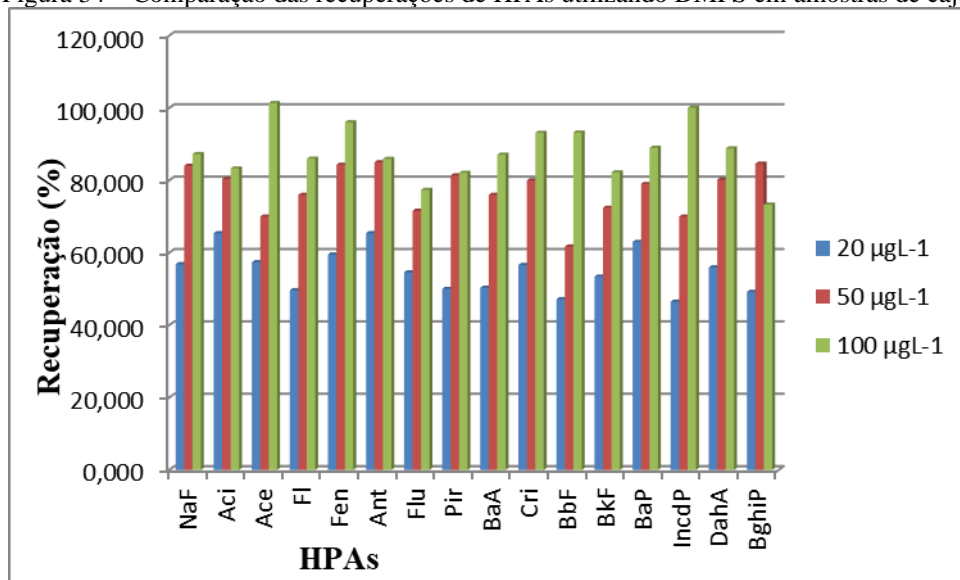


Fonte: Dados da pesquisa.

4.8.4 Comparação da eficiência de extração das amostras de caju e tomate na concentração nas diferentes concentrações

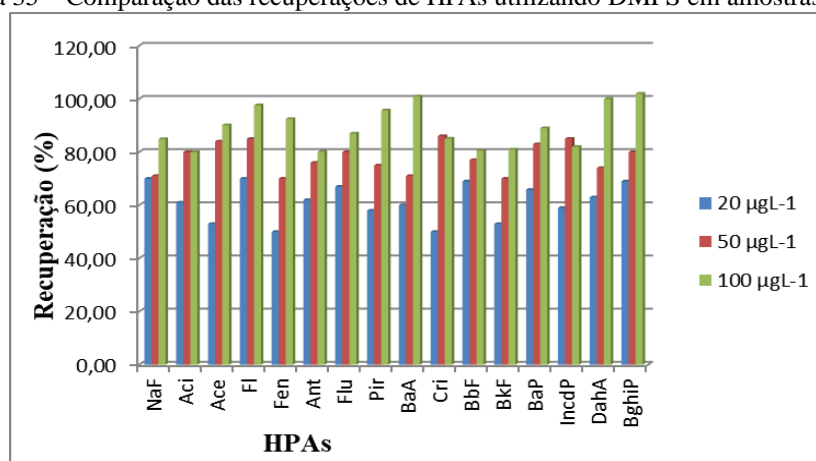
As Figuras 34 e 35 mostram as comparações de percentual de recuperação de HPAs, nas concentrações estudadas, das amostras de caju e tomate, respectivamente. Pode-se observar que à medida que a concentração de HPAs aumenta as recuperações também aumentam. Resultado semelhante foi encontrado no estudo de Sun *et al.* (2006).

Figura 34 – Comparação das recuperações de HPAs utilizando DMFS em amostras de caju.



Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 35 – Comparação das recuperações de HPAs utilizando DMFS em amostras de tomate.



Fonte: Dados da pesquisa.

Os resultados apresentados nas Figuras 34 e 35 mostram que foi possível detectar e quantificar os 16 HPAs estudados, nas três concentrações analisadas. É importante destacar, também, que essa técnica apresentou resultados satisfatórios para a recuperação de HPAs em frutas, tendo como vantagem ser mais rápida, pouco consumo de solvente e poucas etapas envolvidas no processo de extração. A técnica DMFS se torna atrativa e eficiente quando comparada com a técnica de extração Soxhlet.

4.8.5 Análise das amostras de caju e tomate

A Tabela 10 apresenta o resultado da análise das amostras de caju. Nessa amostra verificou-se, portanto, a presença de sete HPAs: naftaleno, fluoreno, pireno, criseno, benzo[b]fluoranteno, indeno[1,2,3-cd]fluoranteno e dibenzo[a,h]antraceno. Os outros HPAs estudados ficaram abaixo de limite de detecção.

Tabela 10- Análise de caju pelo método DMFS.

HPAs	[ng/g] de HPAs em tomate
Naf	0,014
Flu	0,016
Pir	0,027
Cri	0,3757
BbF	0,008
IncdP	0,007
DahA	0,006

Fonte: Dados da pesquisa.

Na Tabela 11 encontra-se o resultado da análise da amostra de tomate. Pode-se observar a presença de oito HPAs: naftelano, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno e benzo[a]pireno.

Tabela 11- Análise de tomate pelo método DMFS.

HPAs	[ng/g] de HPAs em tomate
Naf	0,025
Fen	0,007
Ant	0,010
Flu	0,009
Pir	0,024
BbF	0,004
BkF	0,009
BaP	0,005

Fonte: Dados da pesquisa.

Segundo a literatura a presença desses contaminantes em frutas tem como motivo a poluição ambiental. Portanto, o nível de contaminação dos alimentos vai depender da localização da plantação (CAMARGO; TOLEDO, 2003).

5 CONCLUSÃO

A metodologia empregada apresentou bons resultados de recuperação, precisão, limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) para os HPAs analisados. A precisão, estimada através do coeficiente de variação, mostrou que o método de padrão interno apresentou uma precisão menor que 10 %. A fidelidade baseada no coeficiente de variação encontrada foi bem abaixo de 1 %, sendo considerada satisfatória para a quantificação de HPAs. A linearidade apresentou um coeficiente de correlação ($R^2 > 0,999$) e o limite de detecção e quantificação variaram de 6,71 a 76,12 e de 22,36 a 253,73 μgL^{-1} .

As condições da análise cromatográfica, utilizadas no presente estudo, foram eficientes para identificar os 16 HPAs estudados.

Foram realizadas extrações de HPAs provenientes de amostras de caju e tomate pelos métodos Soxhlet e DMFS, nas concentrações de 20, 50 e 100 μgL^{-1} . De maneira geral, a recuperação se mostrou mais eficiente com o aumento da concentração, tendo sido observado os maiores percentuais de recuperação nas amostras de concentração 100 μgL^{-1} .

Na extração por Soxhelt, nas concentrações de 20 e 50 μgL^{-1} , não foi possível recuperar alguns HPAs em nível de detecção, dado o caráter volátil destes compostos. Por esta técnica, os resultados também mostraram que as extrações foram mais eficientes nas amostras de tomate.

A extração dos HPAs por DMFS nas amostras de tomate e caju variaram em torno de 50 a 100 %. Este método mostrou-se eficiente mesmo para baixas concentrações, pois concentração de 20 μgL^{-1} foi possível recuperar os 16 HPAs analisados em ambas as amostras. Os resultados também mostraram que as extrações foram eficientes para as amostras dos dois frutos analisados.

Em termos comparativos entre as duas técnicas aplicadas, para o material analisado, o método DMFS mostrou-se mais adequado, tendo sido possível recuperar os 16 HPAs analisados em percentuais mais elevados que pelo o método Soxhlet.

Tal resultado indica que a extração de HPAs pela técnica DMFS mostrou-se bastante promissora para a investigação destes em alimentos.

REFERÊNCIAS

- AASLYNG, M.D.; OLESEN, L.D.; JENSEN, K.; MEINERT, L. Content of heterocyclic amines and polycyclic aromatic hydrocarbons in pork, beef and chicken barbecued at home by Danish consumers. **Meat Science**, v. 93, p. 85–91, 2013.
- AGUINAGA, N.; CAMPILLO, N.; VINAS, P.; CORDOBA, M.H. Determination of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons in milk and related products using solid-phase microextraction coupled to gas chromatography–mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 596, p. 285–290, 2007.
- Ahmed, M. T.; Hadi, E. A. Samahy, S. E.; Youssof, K. The influence of baking fuel on residues of polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals in bread. Egypt. **Journal of Hazardous Materials A**, v. 80, p. 1–8, 2000.
- ALBERO, B.; SANCHEZ – BRUNET, C.; TADEO, J.L. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in honey by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography/ mass spectrometry. **Journal of AOAC International**, v. 86, p. 576-582, 2003.
- ANASTASSIADES, S.M.; LEHOTAY, S.; STANBAHER, D.; SCHENCK, F.J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction partitioning and dispersive solid-phase extraction for the determination of pesticides in produce. **Journal of AOAC International**, v. 86, p. 412-431, 2003.
- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), RESOLUÇÃO-RE Nº 899, DE 29 DE MAIO DE 2003.
- ATKINS, P.; JONES, L.; **Princípios de Química**, Porto Alegre, Bookman, 3ª edição, 2006.
- BALLESTERO, E.; SANCHEZ, A. G.; MARTOS, N. R. Simultaneous multidetermination of residues of pesticides and polycyclic aromatic hydrocarbons in olive and olive-pomace oils by gas chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1111, p. 89–96, 2006.
- BARKER, S.A.; Matrix solid phase dispersion (MSPD). **J. Biochem. Biophys. Methods**, v. 70, p. 151–162, 2007.
- BARRANCO, A.; SALCES, R.M. A.; BAKKALI, A.; BERRUETA, L.A. ; GALLO, B. ; VICENTE, F.; SAROB, M. Solid-phase clean-up in the liquid chromatographic determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in edible oils. **Journal of Chromatography A**, v. 988, p. 33–40, 2003.
- BAUMARD, P.; BUDZINSKI, H.; GARRIGUES, P.; SORBE, J. C.; BURGEOT, T.; BELLOCQ, J. Concentrations of PAHs (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons) in various Marine Organisms in Relation to those in Sediments and to Trophic Level. **Marine Pollution Bulletin**, v. 36, p. 951-690, 1998.
- BERMUDES, R.; COBAS, N.; FIGUEIREDO, M. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in two Spanish traditional smoked sausage varieties: “Chorizo gallego” and “Chorizo de

cebolla”. **Meat Science**, v. 89, p. 105–109, 2011.

BERTHOUEX, P.M.; BROWN. **Statistic for environmental engineers**. Boca Raton: Lewis Publishers, 2002.

BETTIN, S.M.; FRANCO, D.W. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em aguardentes. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 25, p. 234-238, 2005.

BIANCHI, F.; CARERI, M.; MANGIA, A.; MATTAROZZI, M.; MUSCI, M. Experimental design for the optimization of the extraction conditions of polycyclic aromatic hydrocarbons in milk with a novel diethoxydiphenylsilane solid-phase microextraction fiber. **Journal of Chromatography A**, v. 1196–1197, p. 41–45, 2008.

BOLANOS, P.P.; FRENICH, A. G.; VIDAL, J.L.M. Polycyclic aromatic hydrocarbons in food and beverages. Analytical methods and trends. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 6303–6326, 2010.

BRITO, N. M.; AMARANTE JUNIOR, O. P. de; POLESE, L.; SANTOS, T. C. R. dos; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégias e discussão. **Pesticidas: R. Ecotoxicol. Meio Ambiente**, v. 13, p. 129-146, 2003.

CAMARGO, M.C.R.; TOLEDO, M.C.F. Polycyclic aromatic hydrocarbons in Brazilian vegetables and fruit. **Food Control**, São Paulo, v. 14, p. 49–53, 2003.

CARUSO, M.S.F.; ALABURDA, J. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos - benzo(a)pireno: uma revisão. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 67, p. 1-27, 2008.

CAVALCANTE, R.M. **Otimização de metodologias de extração e análise de HPAs para determinação da distribuição e ambiental e estimativa de fontes na cidade de Fortaleza**. Tese (Doutorado em Química) – Pós-graduação em Química Orgânica, Universidade Federal do Ceará, Ceará, 2007.

CAVALCANTE, R.M.; LIMA, D.M.; CORREIA, L.M.; NASCIMENTO, R.F. Técnicas de extrações e procedimentos de clean-up para a determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em sedimento da costa do Ceará. **Química Nova**, v. 31, p.1371-1377, 2008.

CHEN, J.; CHEN, S. Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons by lowdensity polyethylene from liquid model and roasted meat. **Food Chemistry**, v. 90, p. 461–469,2005.

CHIARADIA, M.C.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, p. 623-636, 2008.

CHUNG, S.Y.; YETTELLA, R. R.; KIM, J.S.; KWON, K.; KIM, M.C.; MIN, D. B. Effects of grilling and roasting on the levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in beef and pork. **Food Chemistry**, v. 129, p. 1420–1426, 2011.

CHUNG, T.; LIAO, C.; CHEN, M. Comparison of liquid–liquid extraction and solid-phase extraction for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in the milk of Taiwan.

Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, v. 41, p. 178–183, 2010.

CIECIERSKA, M.; OBIEDZINSKI, M.W. Polycyclic aromatic hydrocarbons in infant formulae, follow-on formulae and baby foods available in the Polish market. **Food Control**, v. 21, p. 1166–1172, 2010.

CIECIERSKA, M.; OBIEDZINSKI, M.W. Polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetable oils from unconventional sources. **Food Control**, v. 30, p. 556-562, 2013.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Fundamento de Cromatografia**, Campinas -SP, Unicamp, 2006, 456p.

COTTA, J.A.O.; REZENDE, M.O.O.; LANDGRAF, M.D., Avaliação de solventes de extração por ultrassom usando-se cromatografia líquida de alta eficiência para a determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em solos contaminados. **Química Nova**, v. 8, p. 2026-2033, 2009.

DANYI, S. BROSE, F.; BRASSEUR, C.; SCHNEIDER, Y.J.; LARONDELLE, Y.; PUSSEMIER, L.; ROBBENS, J.; DE SAEGER, S.; ROGISTER, G.M.; SCIPPO, M.L. Analysis of EU priority polycyclic aromatic hydrocarbons in food supplements using high performance liquid chromatography coupled to an ultraviolet, diode array or fluorescence detector. **Analytica Chimica Acta**, v. 633, p. 293–299, 2009.

DE BARROS, C. B. **Validação de Métodos Analíticos**. Biológico. São Paulo, v.64, n.2, p.175-177, 2002.

DE VOS, R. H.; DOKKUM, W.; SCHOUTEN, A.; JONG-BERKHOUT, P. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in total diet samples. **Food and Chemical Toxicology**, v. 28, p. 263-268, 1990.

DEGANI, A.L.G.; CASS, Q.B.; VIEIRA, P.C. Cromatografia: uma breve revisão. **Química Nova na Escola**, v. 7, p. 21-25, 1998.

DILETTI, G.; SCORTICHINI, G.; SCARPONE, R.; GATTI, G.; TORRETI, L.; MIGLIORATI, G. Isotope dilution determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in olive pomace oil by gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1062, p. 247–254, 2005.

DING C.; GANG NI, H.; ZENG, H. Human exposure to parent and halogenated polycyclic aromatic hydrocarbons via food consumption in Shenzhen. **Science of the Total Environment**, v. 443, p. 857–863, 2013.

DING C.; GANG NI, H.; ZENG, H. Parent and halogenated polycyclic aromatic hydrocarbons in rice and implications for human health in China. **Environmental Pollution**, v. 168, p. 80-86, 2012.

DJINOVIC, J.; POPOVIC, A.; JIRA, W. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in different types of smoked meat products from Serbia. **Meat Science**, v. 80, p. 449–456, 2008.

DÓREA, H.S.; LOPES, W.G. Aplicação da técnica de dispersão da matriz em fase sólida (DMFS) na análise de pesticidas em quiabo por CG- EM. **Química Nova**, v. 27, p. 892-896,

2004.

DOST, K.; IDELI, C. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in edible oils and barbecued food by HPLC/UV-Vis detection. **Food Chemistry**, v. 133, 193–199, 2012.

DRABOVA, L.; TOMANIOVA, M.; KALACHOVA, K.; KOCOUREK, V.; HAJLOVA, J.; PULKRABOVA, J. Application of solid phase extraction and two-dimensional gas chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry for fast analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetable oils. **Food Control**, v. 33, p. 489 - 497, 2013.

EL-BEQALI, A.; KUSSAK, A.; REHIM, M.A. Fast and sensitive environmental analysis utilizing microextraction in packed syringe online with gas chromatography-mass spectrometry Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water. **Journal of Chromatography A**, v. 1114, p. 234–238, 2006.

ESSUMANG, D.K.; DODOO, D.K.; ADJEI, J.K. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) contamination in smoke-cured fish products. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 27, p. 128–138, 2012.

ESSUMANG, D.K.; DODOO, D.K.; ADJEI, J.K. Effect of smoke generation sources and smoke curing duration on the levels of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) in different suites of fish. **Food and Chemical Toxicology**, v. 58, p. 86–94, 2013.

FALCO, P. C.; ANDRES, J. V.; CABEZA, A. S.; C. M. LEGUA, C. M.; HERNANDEZ, R. H. New micro method combining miniaturized matrix solid-phase dispersion and in-tube in-valve solid-phase microextraction for estimating polycyclic aromatic hydrocarbons in bivalves. **Journal of Chromatography A**, v. 1211, p. 13–21, 2008.

FALCON, M.S.G.; GRANDE, B. C.; GANDARA, J. S. Minimal clean-up and rapid determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in instant coffee. **Food Chemistry**, v. 90, p. 643–647, 2005.

FARHADIAN, A.; JINAP, S.; HANIFAH, H.N.; ZAIDUL, I.S. Effects of meat preheating and wrapping on the levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in charcoal-grilled meat. **Food Chemistry**, v. 124, p. 141–146, 2011.

FARHADIAN, A.; JINAP, S.; ABAS, F.; SAKAR, Z.I. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in grilled meat. **Food Control**, v. 21, p. 606–610, 2010.

GANZLER, K.; SZINAI, I.; SALGÓ, A. Effective Sample Preparation Method for Extracting Biologically Active Compounds from Different Matrices by a Microwave Technique. **Journal of Chromatography A**, v. 520, p. 257–262, 1990.

GARCIA, C.; GONZALEZ, V.; CORNEJO, C.; FLEMING, H. P. LAGO, N. First evidence of Dinophysistoxin-1 ester and carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked bivalves collected in the Patagonia fjords. Chile. **Toxicon**, v. 43, p. 121–131, 2004.

GOMES, A.S.; NEVES, R.L.; AUCÉLIO, R.; VAN DERVEN, P.H.; PITOMBO, F.B.; MENDES, C.L.T.; ROBERTA L. ZIOLLI, R.L. Changes and variations of polycyclic aromatic hydrocarbon concentrations in fish, barnacles and crabs following an oil spill in a mangrove of

Guanabara Bay, Southeast Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 60, p. 1359–1363, 2010.

GOMES, F.; OLIVEIRA, M.; RAMALHOSA, M.J.; MATOS, C.D.; MORAIS, S. Polycyclic aromatic hydrocarbons in commercial squids from different geographical origins: Levels and risks for human consumption. **Food and Chemical Toxicology**, v. 59, p. 46–54, 2013.

GONCALVES, R.; SCHOLZE, M.; FERREIRA, A. M.; MARTINS, M.; CORREIA, A.D. The joint effect of polycyclic aromatic hydrocarbons on fish behavior. **Environmental Research**, v. 108, p. 205–213, 2008.

GOSETTI, F.; CHIUMINATTO, U.; MAZZUCCO, E.; ROBOTTI, E.; CALABRESE, G.; GENNARO, M.C.; MARENGO, E. Simultaneous determination of thirteen polycyclic aromatic hydrocarbons and twelve aldehydes in cooked food by an automated on-line solid phase extraction ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 6308–6318, 2011.

GREEN, J. M. Peer Reviewed: A Practical Guide to Analytical Method Validation. **Anal. Chem.**, v. 68, p. 305-309, 1996.

GUERIN, T.F. The extraction of aged polycyclic aromatic hydrocarbon (PHA) residues from a clay soil using sonication and a Soxhlet procedure: a comparative study. **J. Environ. Monit.** v. 1, p. 63-67, 1999.

HARRIS, D.C. **Análise Química Quantitativa**, Rio de Janeiro, Livros Técnicos e Científicos Editora S.A, 6ª edição, 2005.

HERNÁNDEZ, M.G.; PINO, V.; ANDERSON, J.L.; AFONSO, A.M. A novel in situ preconcentration method with ionic liquid-based surfactants resulting in enhanced sensitivity for the extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from toasted cereals. **Journal of Chromatography**, v. 1227, p. 29–37, 2012.

HONGLOH, S.; SANAGI, M.M.; IBRAHIM, W.A.; HASAN, M.N. Multi-walled carbon nanotube-impregnated agarose film microextraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in green tea beverage. **Talanta**, 106, 200–205, 2013.

INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos**, DOQ-CGCRE- 008, 36 p. 2003.

ISHIZAKI, A.; SAITOA, K.; HANIOKAB, N.; NARIMATSUB, S.; KATAOKA, H. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in food samples by automated on-line in-tube solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography-fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, Japan, 1217, 5555–5563, 2010.

IUPAC. Use of the terms “recovery” and “apparent recovery” in analytical procedures. **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, p. 2201 – 2205, 2002.

JACQUES, R.J.S.; BENTO, F.M.; ANTONIOLLI, Z.I.; CAMARGO, F.A. De O.; Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Ciência Rural**, v.37, n.4, p. 1192 – 1201, 2007.

JANOSZKA, B. HPLC-fluorescence analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in pork meat and its gravy fried without additives and in the presence of onion and garlic. **Food Chemistry**, v. 126, p. 1344–1353, 2011.

JENKE, D. R. Chromatographic Method Validation: A Review of Current Practices and Procedures. Part II. Guidelines for Primary Validation Parameters. **Instrumentation Science & Technology**, v. 26, p. 19-35, 1998.

KALACHOVA, K.; PULKRABOVA, J.; DRABOVA, L.; Cajka, T.; Kocourek, V.; Hajslova, J. Simplified and rapid determination of polychlorinated biphenyls, polybrominated diphenyl ethers, and polycyclic aromatic hydrocarbons in fish and shrimps integrated into a single method. **Analytica Chimica Acta**, v. 707, p. 84–91, 2011.

KAZEROUNI, N.; SINHA, R.; HSU, C.H.; GRRENBERG, A.; ROTHMAN, N. Analysis of 200 food items for benzo[a]pyrene and estimation of its intake in an epidemiologic study. USA. **Food and Chemical Toxicology**, v. 9, p. 423-436, 2001.

KHAN, S.; AIJUN, L.; ZHANG, S.; HU, Q.; ZHU, Y.G. Accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals in lettuce grown in the soils contaminated with long-term wastewater irrigation. **Journal of Hazardous Materials**, v. 152, p. 506–515, 2008.

KHILLARE, P.S.; JYETHI, D. S.; SARKAR, S. Health risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals via dietary intake of vegetables grown in the vicinity of thermal power plants. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 1642–1652, 2012.

KINSELLA, B.; O'MAHONY, J.; MALONE, E.; MALONEY, M.; CANTWELL, H.; FUREY, A.; DANAHER, M. Current trends sample preparation for growth promoter and residue analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 7977-8015, 2009.

KIPOPOULOU, A.M.; MANOLI, E.; SAMARA, C. Bioconcentration of polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetables grown in an industrial area. Greece. **Environmental Pollution**, v. 106, p. 369-380, 1999.

KISHIKAWA, N.; WADA, M.; KURODA, N.; AKIYAMA, S.; NAKASHIMA, K. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in milk samples by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography B**, v. 789, p. 257–264, 2003.

KUMARI, R.; CHATURVEDI, P.; ANSARI, N.G.; MURTHY, R.C.; PATEL, D.K., Optimization and validation of an extraction method for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in chocolate candies. **Journal of Food Science**, v. 77, p. 34-40, 2012.

LAMBERT, O.; VEYRAND, B.; DURAND, S.; MARCHAND, P.; LE BIZEC, B.; PIROUX, M.; PUYO, S.; THORIN, C.; DELBAC, F.; POULIQUEN, H. Polycyclic aromatic hydrocarbons: Bees, honey and pollen as sentinels for environmental chemical contaminants. **Chemosphere**, v. 86, p. 98–104, 2012.

LANÇAS, F.M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**, São Carlos: Rima, 2004.

LEHOTAY, S. J.; SON, K.A.; KWON, H.; KOESUKWIWAT, U. FU, W., MASTOVSKA, K. *et al.* Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, ed. 16, p. 2548 – 2560, 2010.

LIANG, Y.; TSE, M.F.; YOUNG, L.; WONG, M.H. Distribution patterns of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the sediments and fish at Mai Po Marshes Nature Reserve. **Water Research**, v. 41, p. 1303 – 1311, 2007.

LIN, D.; TU, Y.; ZHU, L. Concentrations and health risk of polycyclic aromatic hydrocarbons in tea. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, p. 41–48, 2005.

LIN, G.; WEIGEL, S.; TANG, B.; SCHULZ, C.; SHEN, J. The occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons in Peking duck: Relevance to food safety assessment. **Food Chemistry**, v. 129, p. 524–527, 2011.

LIU, W.; QI, J.; YAN, L. JIA, Q. YU, C. Application of poly (butyl methacrylate-co-ethylene glycol dimethacrylate) monolith microextraction coupled with high performance liquid chromatography to the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked meat products. **Journal of Chromatography**, v. 879, p. 3012– 3016, 2011.

LOH, S.H.; SANAGI, M.M.; WAN IBRAHIM, W.A.; HASAN, M.N. Multi-walled carbon nanotube-impregnated agarose film microextraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in green tea beverage. **Talanta**, v. 106, p. 200–205, 2013.

LORENZO, J.M.; PURRINOS, L.; BERMUDEZ, R.; COBAS, N.; FIGUEIREDO, M.; FONTÁN, M.C.G.; Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in two Spanish traditional smoked sausage varieties: “Chorizo gallego” and “Chorizo de cebolla”. **Meat Science**, v. 89, p. 105–109, 2011.

LORENZO, J.M.; PURRINOS, L.; FONTÁN, M.C.G.; FRANCO, D. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in two Spanish traditional smoked sausage varieties: “Androlla” and “Botillo”. **Meat Science**, v. 86, p. 660–664, 2010.

LOUTFY, N.; FUERHACKER, M.; TUNDO, P.; RACCANELLI, S.; M. AHMED, M.T. Monitoring of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans, dioxin-like PCBs and polycyclic aromatic hydrocarbons in food and feed samples from Ismailia city. **Chemosphere**, v. 66, p. 1962–1970, 2007.

LOVELAND, P.M.; REDDY, A.P.; PEREIRA, C.B.; BRAILEY, G.S. Application of matrix solid-phase dispersion in the determination of dibenzo[a,h]pyrene content of experimental animal diets used in a large scale study. **Journal of chromatography A**, v. 932, p. 33–41, 2001.

LUND, M.; OLESEN, L.D.; CHRISTENSEN, J.H. Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from smoked fish using pressurized liquid extraction with integrated fat removal. **Talanta**, v. 79, p. 10–15, 2009.

MAFFEI, D.F.; NOGUEIRA, A.R.A; BRONDI, S.H.G.; Determinação de Resíduos de Pesticidas em Plasma Bovino por Cromatografia Gasosa-Espectometria de Massas. *Quim. Nova*, v.32, n. 7, p. 1713-1716, 2009.

MAJORS, R. E. QuEChERS — A New Technique for Multiresidue Analysis of Pesticides in Foods and Agricultural Samples. *LC-GC Europe*, v. 20, p. 574 – 581, 2007.

MARTINS, C. C. **Marcadores Orgânicos Geoquímicos em testemunhos de sedimento do Sistema Estuarino de Santos e São Vicente, SP: um registro histórico da introdução de hidrocarbonetos no ambiente marinho.** Tese (Doutorado em Ciências, área de Oceanografia, Química e Geológica), Universidade de São Paulo (USP), 2005, 215p.

MARTORELL, I.; PERELLÓ, G.; MARTÍ-CID, R.; CASTELL, V.; LLOBET, J.M.; DOMINGO, J.L.; Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in foods and estimated PAH intake by the population of Catalonia, Spain: Temporal trend. *Environment International*, v. 36, p. 424–432, 2010.

MOHAMMADI, A.; MOHAMMADI, V.G.; HARATIAN, P.; KHAKSAR, R.; CHAICHI, Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked fish samples by a new microextraction technique and method optimization using response surface methodology. *Food Chemistry*, v. 141, p. 2459–2465, 2013.

MOHAMMADI, V.G; MOHAMMADI, A ; HASHEMI, M.KHAKSAR,R ; HARATIAN,P. Microwave-assisted extraction and dispersive liquid–liquid microextraction followed by gas chromatography–mass spectrometry for isolation and determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked fish. *Journal of Chromatography, A*, v. 1237, p. 30– 36, 2012.

NACCARI, C.; CRISTANI, M.; GIOFRÈ, F.; FERRANTE, M. SIRACUSA, L.; TROMBETTA, D. PAHs concentration in heat-treated milk samples. *Food Research International*, v. 44, p. 716–724, 2011.

NETTO, A.D.P.; MOREIRA, J.C.; DIAS, A.E.X.O.; ARBILLA, G.; FERREIRA, L.F.V.; OLIVEIRA, A.S. Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e seus derivados nitrados (NHPAS): uma revisão metodológica. *Química Nova*, v. 23, p. 765 - 773, 2000.

NETTO, A.D.P.; BARRETO, R.P.; MOREIRA, J.C.; ARBILLA, G. Polycyclic aromatic hydrocarbons in total suspended particulate of Niterói, RJ, Brazil: a comparasion of summer and winter samples. *Environmental Contamination and Toxicology*, v. 69, p. 173-180, 2002.

ORECCHIO, S.; CIOTTI, V.P.; CULOTTA, L. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in coffee brew samples: Analytical method by GC–MS, profile, levels and sources. *Food and Chemical Toxicology*, v. 47, p. 819–826, 2009.

ORECCHIO, S.; PAPUZZA, V. Levels, fingerprint and daily intake of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in bread baked using wood as fuel. *Journal of Hazardous Materials*, v. 164, p. 876–883, 2009.

PARAÍBA, L.C.; QUEIROZ, S.C.N.; MAIA, A.H.N.; FERRACINI, V.L. Bioconcentration

factor estimates of polycyclic aromatic hydrocarbons in grains of corn plants cultivated in soils treated with sewage sludge. **Science of the Total Environment**, v. 408, p. 3270–3276, 2010.

PAYANAN, T.; LEEPIPATPIBOON, N.; VARANUSUPAKUL, P. Low-temperature cleanup with solid-phase extraction for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in edible oils by reversed phase liquid chromatography with fluorescence detection. **Food Chemistry**, v. 141, p. 2720–2726, 2013.

PENA, T.; PENSADO, L.; CASAIS, C.; MEJUTO, C.; LUU, R. P.T.; CELA, R. Optimization of a microwave-assisted extraction method for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons from fish samples. Spain. **Journal of Chromatography A**, v. 1121, p. 163–169, 2006.

PENSADO, L.; CASAIS, M.C.; MEJUTO, M.C.; CELA, R. Application of matrix solid-phase dispersion in the analysis of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in fish samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1077, p. 103–109, 2005.

PEREIRA NETTO, A.D.; BARRETO, R.P.; MOREIRA, J.C.; ARBILLA, G., Polycyclic aromatic hydrocarbons in total suspended particulate of Niteroi, RJ, Brazil: A comparison of summer and winter samples. **Bull Environ. Contam. Toxicol.**, v. 69, p. 173-180, 2002.

PEREIRA, A.P de P; ANDRADE, J.B. de; MIGUEL, A.H. Determination of 16 priority aromatic hydrocarbons in particulate matter by HRGC-MS after extraction by sonication. **Analytical Sciences**, v. 17, p. 1229-1231, 2001.

PERUGINI, M.; VISCIANO, P.; GIAMMARINO, A.; MANERA, M.; DINARDO, W.; AMORENA, M. Polycyclic aromatic hydrocarbons in marine organisms from the Adriatic Sea. **Chemosphere**, v. 66, p. 1904–1910, 2007.

PHILLIPS, D.H. Polycyclic aromatic hydrocarbon in the diet. **Mutation Research /Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 443, p. 139-147, 1999.

PIMENTEL, I.Y.; GONZALEZ, R.F.; CARBALLO, E.M.; GANDARA, J.S. Searching ingredients polluted by polycyclic aromatic hydrocarbons in feeds due to atmospheric or pyrolytic sources. **Food Chemistry**, v. 135, p. 2043–2051, 2012.

PIMENTEL, I.Y.; CARBALLO, E.M.; REGUEIRO, J.; GANDARA, J.S. The potential of solvent-minimized extraction methods in the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in fish oils. **Food Chemistry**, v. 139, p. 1036–1043, 2013.

PINHO, G.P; NEVES, A.A.N; QUEIROZ, M.E.L.R. Análise de resíduos de agrotóxicos em tomates empregando dispersão da matriz em fase sólida (DMFS) e cromatografia gasosa. **Química Nova**, v. 32, p. 92-98, 2009.

PRESTES, O.D. Método rápido para determinação simultânea de resíduo de agrotóxicos e medicamentos veterinários em alimento de origem animal por LC-MS/MS. **Tese de Doutorado em Química**, UFSM, Santa Maria, 2011.

PURCARO, G.; MORRISON, P.; MORET, S.; CONTE, L.S.; MARRIOTT, P.J.

Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetable oils using solid-phase microextraction-comprehensive two-dimension al gas chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1161, p. 284–291, 2007.

PURCARO, G.; MORET, S.; CONTE, L.S. Optimisation of microwave assisted extraction (MAE) for polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) determination in smoked meat. **Meat Science**, v. 81, p. 275–280, 2009.

RAMALHOSA, M.J.; PAIGA, P.; MORAIS, S.; RAMOS, S.; MATOS, C.D.; OLIVEIRA, M.B.P.P. Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in fish: optimisation and validation of microwave-assisted extraction. **Food Chemistry**, v. 135, p. 234–242, 2012b.

RAMALHOSA, M.J.; PAIGA, P.; MORAIS, S.; RAMOS, S.; MATOS, C.D.; OLIVEIRA, M.B.P.P. Polycyclic aromatic hydrocarbon levels in three pelagic fish species from Atlantic Ocean: Inter-specific and inter-season comparisons and assessment of potential public health risks. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 162–167, 2012a.

REZAEI, M.; YAMINI, M.; MORTEZA, S.; ABOLFAZL, F.; MOHAMMAD, N.; MOHAMMAD, H.; Supercritical fluid extraction combined with dispersive liquid-liquid microextraction as a sensitive and efficient sample preparation method for determination of compounds in solid samples. **Journal of Supercritical fluids**, v. 55, p. 161–168, 2010.

RIBANI, M.; BOTTOL, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771–780, 2004.

RIDGWAY, K.; LALLJIE, S. P.D.; SMITH, R. M. Sample preparation techniques for the determination of trace residues and contaminants in foods. **Journal of Chromatography A**, v. 1153, p. 36–53, 2007.

ROSEIRO, L.C.; GOMES, A.; SANTOS C. Influence of processing in the prevalence of polycyclic aromatic hydrocarbons in a Portuguese traditional meat product. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 1340–1345, 2011.

SAINT-AUBERT, B.; COOPER, J.F.; ASTRE, C.; SPILLOTIS, J.; JOYEUX, H. Evaluation of the induction of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by cooking on two geometrically different types of barbecue. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 5, p. 257–263, 1992.

SALGUEIRO, L.R.; CARBALLO, E.M.; FALCON, M.S.G.; Barreiro, C.G. GANDARA, J.S. Occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons and their hydroxylated metabolites in infant foods. **Food Chemistry**, v. 115, p. 814–819, 2009.

SALGUEIRO, L.R.; CARBALLO, E.M.; FALCON, M.S.G.; GANDARA, J.S. Effects of a chemical company fire on the occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons in plant foods. **Food Chemistry**, v. 108, p. 347–353, 2008.

SALGUEIRO, L.R.; FALCON, M.S.G.; CARBALLO, E.M.; GANDARA, J.S., Effects of toasting procedures on the levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in toasted bread. **Food Chemistry**, v. 108, p. 607–615, 2008.

SANTOS, C.; GOMES, A.; ROSEIRO, L.C. Polycyclic aromatic hydrocarbons incidence in Portuguese traditional smoked meat products. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 2343–2347, 2011.

SERPE, F.P.; ESPOSITO, M.; GALLO, P.; SERPE, L. Optimisation and validation of an HPLC method for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in mussels. **Food Chemistry**, v. 122, p. 920–925, 2010.

SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. **Journal of Chromatography A**, v. 987, p. 57 – 66, 2003.

SILVA, F.S.; CRISTALE, J.; RIBEIRO, M.L.; DE MARCHI, M.R.R. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in rawcane sugar (rapadura) in Brazil. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, p. 346–350, 2011.

SIMKO, P.; Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked meat products and smoke flavouring food additives. **Journal of Chromatography B**, v. 770, p. 3–18, 2002.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. **Princípios de análise instrumental**, Porto Alegre, Bookmann, 5ª edição, 2002.

STIJN, F. V.; KERKHOFF, M.A.T.; VANDEGINSTE, B.G.M. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in edible oils and fats by on-line donor-acceptor complex chromatography and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 750, p. 263-273, 1996.

SUN, P.; WEAVERS, K. L.; TAERAKUL, P.; WALKER, H. W. Characterization of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on Lime Spray Dryer (LSD) Ash Using Different Extraction Methods. **Chemosphere**, v. 62, 2. ed., p. 265-274, 2006.

TAO, S.; CUI, Y.H.; XU, F.L.; LI, B.G.; CAO, J.; LIU, W.X.; SCHMITT, G.; WANG, X.J.; SHEN, W.R.; QING, B.P.; SUN, R. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in agricultural soil and vegetables from Tianjin. **The Science of the Total Environment**, v. 320, p. 11–24, 2004.

TAO, S.; JIAO, X.C.; CHEN, S.H.; LIU, W.X.; COVENEY JR, R.M.ZHU, L.Z.; LUO, Y.M. Accumulation and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in rice (*Oryza sativa*). **Environmental Pollution**, v. 140, p. 406-415, 2006.

TAO, S.; JIAO, X.C.; CHEN, S.H.; XU, F.L.; LI, Y.J.; LIU, F.Z. Uptake of vapor and particulate polycyclic aromatic hydrocarbons by cabbage. **Environmental Pollution**, v. 140, p. 13-15, 2006.

TFOUNI, S.A.V.; MACHADO, R.M.D.; CAMARGO, M.C.R.; VITORINO, S.H.P.; VICENTE, E.; TOLEDO, M.C.F. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in cachaça by HPLC with fluorescence detection. **Food Chemistry**, v. 101, p. 334–338, 2007b.

TFOUNI, S.A.V.; SERRATE, C.; LEME, F.M.; CAMARGO, M.C.R.; TELES, C.R.A.; CIPOLLI, K.M.V.A.B.; FURLANI, R.P.Z. Polycyclic aromatic hydrocarbons in coffee brew: Influence of roasting and brewing procedures in two *Coffea* cultivars. **Food Science and Technology**, v. 50, p. 526-530, 2013.

TFOUNI, S.A.V.; SOUZA, N.G.; NETO, M.B.; LOREDO, I.S.D.; LEME, F.M.; FURLANI, R.P.Z. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in sugarcane juice. **Food Chemistry**, v.116, p. 391–394, 2009.

TFOUNI, S.A.V.; TOLEDO, M.C.F. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in cane sugar. **Food Control**, v. 18, p. 948–952, 2007.

TFOUNI, S.A.V.; VOTORINO, S.H.P.; TOLEDO, M.C.F.; Efeito do processamento na contaminação de cana-de-açúcar e derivados por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. **Ciência Tecnologia Alimentar**, v. 27, p. 76-82, 2007.

US EPA – Soxhlet extraction – Method 3540 C, 1996.

VEYRAND, B. ; BROSSEAUD, A. ; SARCHER, L.; VARLET, V.; MONTEAU, F.; MARCHAND, P.; ANDRE, F.; LE BIZEC, B. Innovative method for determination of 19 polycyclic aromatic hydrocarbons in food and oil samples using gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry based on an isotope dilution approach. France. **Journal of Chromatography A**, v. 1149, p. 333–344, 2007.

VIEGAS, O.; NOVO, P.; PINHO, O.; FERREIRA, I.M.P.L.V.O. Effect of charcoal types and grilling conditions on formation of heterocyclic aromatic amines (HAs) and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in grilled muscle foods. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 2128–2134, 2012.

VIEGAS, O.; NOVO, P.; PINHO, O.; FERREIRA, I.M.P.L.V.O. A comparison of the extraction procedures and quantification methods for the chromatographic determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in charcoal grilled meat and fish. **Talanta**, v. 88, p. 677–683, 2012.

VIKSNA, I.S.; BARTKEVICS, V.; KUKARE, A.; MOROZOV, A. Polycyclic aromatic hydrocarbons in meat smoked with different types of wood. **Food Chemistry**, v. 110, p. 794–797, 2008.

VIVES, I.; GRIMALT, J.O.; FERNANDEZ, P.; ROSSELAND, B. Polycyclic aromatic hydrocarbons in fish from remote and high mountain lakes in Europe and Greenland. **Science of the Total Environment**, v. 324, p. 67–77, 2004.

VIVES, I.; GRIMALT, J.O.; Method for integrated analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine compounds in fish liver. **Journal of Chromatography B**, v. 768, p. 247–254, 2002.

VOUTSA, D.; SAMARA, C. Dietary intake of trace elements and polycyclic aromatic hydrocarbons via vegetables grown in an industrial Greek area. **The Science of the Total Environment**, v. 218, p. 203-216, 1998.

WANG, D.Q.; YU, Y.X.; ZHANG, X.Y.; ZHANG, S.H.; PANG, Y.P.; ZHANG, X.L.; YU, Z.Q.; WU, M.H.; MOFU, J. Polycyclic aromatic hydrocarbons and organo chlorine pesticides in fish from Taihu Lake: Their levels, sources, and biomagnification. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 82, p. 63–70, 2012.

WANG, H.; YU, S.; CAMPIGLIA, A. D. Solid-phase nano-extraction and laser-excited time-resolved Shpol'skii spectroscopy for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in drinking water samples. **Analytical Biochemistry**, v. 385, p. 249–256, 2009.

WANG, J.H.; GUO, C. Ultrasonication extraction and gel permeation chromatography clean-up for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in edible oil by an isotope dilution gas chromatography–mass spectrometry. China, **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 4732–4737, 2010.

WRETLING, S.; ERIKSSON, A.; ESKHULT, G.A.; LARSSON, B. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Swedish smoked meat and fish. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 23, p. 264 – 272, 2010.

WU, S.; YU, W. Liquid–liquid extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in four differentiated oils from China. **Food Chemistry**, v. 134, p. 597 – 601, 2012.

YAKOUB, S. A.; SAEED, T.; HASHASH, H. A. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Edible Tissue of Fish from the Gulf After the 1991 Oil Spill. **Marine Pollution Bulletin**, v. 27, p. 297-301, 1993.

YURCHENKO, S.; MOLDER, U. The determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked fish by gas chromatography mass spectrometry with positive-ion chemical ionization. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 18, p. 857 – 869, 2005.

YUSTY, M.A. L.; DAVINA, J.L.C. Supercritical fluid extraction and high-performance liquid chromatography–fluorescence detection method for polycyclic aromatic hydrocarbons investigation in vegetable oil. **Food Control**, v. 16, p. 59 – 64, 2005.

ZHANG, H.; XUE, M.; DAI, Z. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in aquatic products by HPLC-fluorescence. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 23, p. 469 – 474, 2010.

ZHANG, S.; NIU, H.; ZHANG, Y.; LIU, J.; SHI, Y.; ZHANG, X.; CAI, Y. Biocompatible phosphatidylcholine bilayer coated on magnetic nanoparticles and their application in the extraction of several polycyclic aromatic hydrocarbons from environmental water and milk samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1238, p. 38 – 45, 2012.

ZUIN, V. G.; MONTERO, L.; BAUER, C.; POPP, P. Stir bar sorptive extraction and high-performance liquid chromatography–fluorescence detection for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in Mate teas. **Journal of Chromatography A**, v. 1091, p. 2–10, 2005.